



# Identification d'un nouveau mécanisme de contrôle de l'homéostasie des lymphocytes T iNKT et MAIT

Stéphane Gérard

## ► To cite this version:

Stéphane Gérard. Identification d'un nouveau mécanisme de contrôle de l'homéostasie des lymphocytes T iNKT et MAIT. Autre. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05TO22 . tel-00754934

**HAL Id: tel-00754934**

**<https://theses.hal.science/tel-00754934>**

Submitted on 20 Nov 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# **THESE DE DOCTORAT**

UNIVERSITE PARIS V - RENE DESCARTES

ECOLE DOCTORALE : GC2ID - GENETIQUE, CELLULES,  
IMMUNOLOGIE, INFECTIOLOGIE, DEVELOPPEMENT

**Spécialité : Immunologie**

Présentée par

**Stéphane GERART**

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris V

## **Identification d'un nouveau mécanisme de contrôle de l'homéostasie des lymphocytes T iNKT et MAIT**

Soutenue le 26 septembre 2012, devant le jury composé de :

Mr	Olivier	HERMINE	Président
Mr	Sylvain	LATOUR	Directeur de Thèse
Mr	Julien	MARIE	Rapporteur
Mr	Emmanuel	TREINER	Rapporteur
Mr	Paolo	DELLABONA	Examineur
Mr	Alain	FISCHER	Examineur

# Identification d'un nouveau mécanisme de contrôle de l'homéostasie des lymphocytes T iNKT et MAIT

Les cellules *Invariant Natural Killer T* (iNKT) représentent une sous-population particulière de cellules T qui se distingue par son développement, ses fonctions et les ligands qu'elle reconnaît. Chez l'homme, les cellules iNKT expriment le réarrangement V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18/V $\beta$ 11 et reconnaissent des glycosphingolipides présentés par la molécule monomorphe du CMH de classe I CD1d. De plus, elles produisent rapidement de grandes quantités de cytokines, et sont ainsi considérées comme des cellules T ayant des caractéristiques innées. Les mécanismes moléculaires qui régulent l'homéostasie des cellules iNKT ne sont pas complètement compris.

La protéine XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis*) est un inhibiteur physiologique des caspases 3, 7 et 9. Des mutations du gène *XIAP* sont à l'origine du syndrome lymphoprolifératif lié à l'X de type 2 (XLP-2), un déficit immunitaire primitif (DIP) caractérisé par une susceptibilité accrue à l'infection par le virus Epstein Barr (EBV). Les patients souffrant du XLP-2 présentent une forte réduction de leur nombre de cellules iNKT dans le sang.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai montré que XIAP est requis pour la survie des cellules iNKT humaines. Cette fonction de XIAP corrèle avec un phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT qui n'est pas retrouvé dans les cellules T conventionnelles. La susceptibilité accrue à l'apoptose des cellules iNKT est observée en utilisant des stimuli de la voie intrinsèque ou extrinsèque de l'apoptose. Les cellules iNKT, contrairement aux cellules T conventionnelles expriment des quantités élevées de protéines pro-apoptotiques comme les caspases 3 ou 7 ou Bid. Ce phénotype pro-apoptotique est acquis de manière précoce, puisqu'il est déjà présent dans des cellules iNKT de thymus ou de sang de cordon. L'extinction de XIAP dans des cellules iNKT et l'analyse de patients déficients en XIAP indiquent que XIAP est un inhibiteur efficace de l'apoptose dans les cellules iNKT alors qu'il n'a qu'un effet modéré dans les cellules T conventionnelles. J'ai ensuite montré que le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT est dépendant de l'expression du facteur de transcription PLZF. Celui-ci est déjà connu comme étant nécessaire à l'acquisition des fonctions effectrices de ces cellules. De manière concordante, la surexpression de PLZF dans des cellules T conventionnelles conduit à un phénotype pro-apoptotique et à une augmentation de l'expression de la caspase 3.

Récemment, une deuxième population de cellules T invariantes, les cellules MAIT (*Mucosal Associated Invariant T*) a été décrite. Ces cellules expriment un TCR semi-invariant V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33 et partagent avec les cellules iNKT certaines caractéristiques qui en font des cellules T innées comme les cellules iNKT. De la même manière que les cellules iNKT, les cellules MAIT ont un phénotype pro-apoptotique et sont diminuées dans le sang des patients déficients en XIAP. Ce phénotype pro-apoptotique est aussi dépendant de PLZF.

De manière intéressante, un patient déficient en XIAP et ayant un nombre normal de cellules iNKT a été identifié. Ce patient n'a pas encore rencontré l'EBV, suggérant que la diminution des cellules iNKT chez les patients déficients en XIAP est due à une apoptose augmentée dans un contexte d'infection par l'EBV. Enfin, j'ai obtenu des données préliminaires suggérant que l'EBV utilise un mécanisme d'échappement aux cellules iNKT en diminuant l'expression de CD1d à la surface des cellules B.

Mon travail de thèse a donc permis d'identifier une voie de régulation inconnue des lymphocytes T innés qui dépend de XIAP et de PLZF. PLZF est donc un facteur clé pour la différenciation et l'homéostasie des cellules T innées en régulant l'acquisition de leurs fonctions effectrices et en limitant leur survie. Ces observations ont aussi permis d'identifier le premier DIP associé à un déficit en cellules MAIT. Enfin, ces résultats suggèrent un rôle des cellules iNKT dans le contrôle de l'infection par l'EBV.

Mots clés :

Cellules T innées, iNKT, MAIT, Apoptose, XIAP, PLZF, EBV, XLP, syndrome de Purtilo

# Identification of a new mechanism that controls the homeostasis of iNKT and MAIT T lymphocytes

Invariant natural killer T (iNKT) lymphocytes represent a peculiar T cell-lineage that differs from conventional T cells by its development, function, and ligands it recognizes. In humans, iNKT cells express an invariant TCR made of the V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18/V $\beta$ 11 rearrangement, which recognizes glycosphingolipids presented by the MHC class I monomorphic molecule CD1d. Moreover, they rapidly produce high amounts of cytokines when stimulated and are thus considered as innate-like T cells. The molecular mechanisms that control the homeostasis of iNKT are poorly understood. XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis) is a physiological inhibitor of caspases 3, 7 and 9 and is mutated in the X-linked lymphoproliferation syndrome 2 (XLP-2), a rare primary immunodeficiency (PID) characterized by a peculiar susceptibility to Epstein-Barr virus (EBV) infection. Patients with a XIAP deficiency exhibit a strong reduction of their iNKT cells in blood.

Here, I report that XIAP is required for the survival of iNKT cells in humans. The requirement of XIAP correlates with a pro-apoptotic phenotype of iNKT cells that is not observed in conventional T cells. The increased susceptibility to apoptosis of iNKT cells was observed upon stimuli that trigger either extrinsic or intrinsic apoptosis pathways. iNKT cells by contrast to conventional T cells express elevated amounts of pro-apoptotic molecules including caspases 3 or 7 and Bid. The pro-apoptotic phenotype of iNKT cells is early acquired since iNKT cells from cord blood and thymus display a similar pro-apoptotic phenotype. Knock-down of XIAP in iNKT cells and analysis of XIAP-deficient humans indicate that XIAP is a potent inhibitor of apoptosis in iNKT cells while it has only a moderate effect in conventional T cells. I also show that this pro-apoptotic phenotype of iNKT cells is dependent of the expression of the transcription factor PLZF. This factor is already known to be necessary for the acquisition of the effector functions of these cells. Conversely, over expression of PLZF in conventional T cells leads to a pro-apoptotic phenotype and to an increased expression of caspase 3.

Recently, a second invariant T cell subpopulation, the mucosal associated invariant T (MAIT) cells was identified both in humans and mice. These cells express a semi-invariant TCR made of V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33 rearrangements and share with iNKT cells a number of developmental, functional and phenotypical features that lead to consider MAIT cells as innate-like T cells like iNKT cells. Similarly, MAIT cells also exhibit a pro-apoptotic phenotype and are decreased in XIAP-deficient humans. The pro-apoptotic phenotype of MAIT cells is also dependent on PLZF.

Interestingly, one XIAP-deficient patient with normal iNKT cell number was identified. This patient has not yet encountered EBV, suggesting that reduction of iNKT cells in XIAP-deficient patients is likely due to increased apoptosis in the context of EBV infection. I also show that EBV might have an escape mechanism from iNKT cells by down-regulating the expression of CD1d on the surface of B cells.

My thesis works identify a previously unknown pathway controlling innate T cell homeostasis depending on XIAP and PLZF. PLZF is thus a key factor involved in the differentiation and the homeostasis of innate T cells by regulating the acquisition of their effector functions and their survival. I also identified the first PID associated with a defect in MAIT cells. Finally, these results provide evidences that iNKT cells might play a role against EBV infection.

Keywords:

Innate T cells, iNKT, MAIT, Apoptosis, XIAP, PLZF, EBV, XLP, Purtilo's syndrome



Ce travail de thèse a été effectué dans le laboratoire suivant :  
INSERM U768  
Développement Normal et Pathologique du Système Immunitaire  
Hôpital Necker-Enfants Malades  
149 rue de Sèvres 75015 Paris-France

Les illustrations de l'introduction ont été en partie réalisées par Jean-Pierre Laigneau, IRNEM  
IFR 94.

## Remerciements :

Me voilà arrivé à ce qui est le dernier mémoire de ma formation scientifique.

Merci tout d'abord aux membres du jury d'avoir accepté de juger cette thèse. Merci également à l'ARC pour avoir financé la fin de cette thèse.

Petit message pour l'unité U768, dont j'ai arpenté les couloirs pendant 3 ans et demi... J'espère partir en vous laissant un bon souvenir. Cette thèse aura été pour moi l'occasion de réaliser un travail approfondi et m'aura permis d'apprendre à me dépatouiller avec mes mains. J'ai également énormément appris scientifiquement, que ce soit dans l'étude de mon sujet, mais aussi en discutant avec les autres membres de l'unité.

Merci à Alain pour m'avoir accepté dans son laboratoire et merci à Sylvain pour son accueil dans son équipe. Les discussions scientifiques passionnées du vendredi soir à 21h vont me manquer. Merci à Patrick le cloning-man pour tous ses conseils avisés de restrictions. Merci à Sophie Sibéril qui est l'initiatrice de ce projet et qui m'a formé aux premières expériences de cette thèse.

Merci à la team Carambar, la dream team de cette unité... (C'est dire si la recherche française va mal ☺) :

- Christelle, notre mère à tous, pour m'avoir formé et conseillé tout au long de cette thèse, et pour sa pollution sonore. Allez, je ne le dirai qu'une seule fois : tu vas me manquer. Mais bon on se reverra puisque je te le rappelle, tu me dois un resto.

- Cindy avec qui j'ai partagé mes premiers mois de thèse, pas mal de fous rires, et de fêtes foraines !

- Manu le picard masqué force rose, toujours gentil et de bonne humeur malgré son invraisemblable poisse.

- Noé pour sa bonne humeur éternelle et sa môman pour les ravitaillements en quiches et douceurs sucrées.

- Fabian, Geoffrey, votre patience biochimique force le respect.

- Rémy, le fantôme de l'opéra, bon courage pour la suite.

Merci enfin à tous ceux que j'ai pu croiser dans ces murs :

Une pensée particulière pour Pauline alias poulpy (tiens d'ailleurs, je t'ai dit que j'ai eu un excellent comme évaluation de monitorat ?), ma voisine, ma complice de régression infantile, mon rayon de soleil.

Merci au vénérable ancien de ces lieux, Vincent. Malgré ton âge avancé, tu as toujours une blague fine et fraîche sous le coude. Reste sur tes gardes, je serai toujours là pour te balancer de la glace quand tu ne t'y attends pas.

Agathe (même si Donnie Darko sucks) pour le partage de ses multiples passions.

Mathieu pour ses pizzas hawaïennes et ses punchs tahitiens et même si il est le chouchou des dames.

Isabelle, ma môman du labo, pour ses conseils et sa douceur (j'attends toujours mon augmentation d'argent de poche !!!).

Tanguy le padawan et Sven le blasé, le Yin et le Yang de ce bureau.

Un grand merci à Aude, le docteur es vampirisation pour les nombreux prélèvements.

Merci à Shu, Gaby (je ne serai finalement pas ton externe ☺), Despina, Laetitia, Jean-Pierre, Anne, Virginie, Gaël, Geneviève, Roxane, Marie-Claude, Nina, Eva, Frédéric, Chantal, Emmanuelle, Corinne, Sonia et Marina avec qui j'ai eu des interactions, scientifiques ou non d'ailleurs.

Oulé, Christine, Malika et Catherine qui par leur travail dans l'ombre permettent la bonne marche de ce laboratoire.

Aux « sportifs » du laboratoire : Franck (quand tu veux pour ta revanche tennistique), Aurélien (même s'il vient de Maubeuge), Christian et Kamel.

Merci à Capucine pour ses conseils avisés et merci aux techniciennes du CEDI Aminata, Stéphanie (et sa dextérité pour nous prélever), Chantal, Corinne, Monique. Un énorme merci à Nathalie pour ses conseils et ses sourires en or.

Merci à tous ceux que j'ai croisé dans ces murs et qui sont déjà partis :

Marjorie Nadal, Nadine, Fabien, Andréa, Julien, Chantal, Houda (rendez vous en 2020 pour aller voir les baleines en Islande et avant à Nantes), Débora, Paola, Nathalie, Delphine et Estelle.

Merci à Anne Brignier et Chi Zhang pour leur aide technique et matérielle dans la réalisation des dernières expériences de cette thèse.

Au-delà d'une aventure scientifique de tous les jours, cette thèse aura surtout été une aventure humaine extraordinaire. Merci à vous pour cela.

Je tiens également à remercier mes amis et proches :

Merci en vrac à Aloïs, Raymond et Justine, Guillaume et Clotilde, Guillaume et Claire, Charles et Aurélie, Amandine, Juliette, Cathy, **Perrine** (je ne suis pas rancunier tu vois), Florent (je te noie dans la masse pour faire ressortir ton importance durant cette thèse et durant ma vie), Yohan, Maellen, le PFTBC (Tchoukball forever, merci à Julien pour cette découverte), l'ASPTT plongée. Vous m'avez permis et parfois obligé à m'éloigner du labo pour mon plus grand bien et je vous en remercie.

Merci à ma famille.

A ma mère tout d'abord, pour son soutien et le ravitaillement en délicieux petits plats, qui faisaient des jaloux au labo ! Une pensée émue pour mon père en ce jour de soutenance.

A Virginie et Sandrine, mes grandes sœurs, toujours là pour me féliciter ou me remonter les bretelles, et leurs maris Yann et Frédéric.

Aux 5 petites fripouilles, Clément, Léa, Marina, Lucas et Eva pour leurs cris et leurs sourires.

Enfin, the last but not the least, merci à Aguilar (alias Docteur Claire, ma mitochondrie, Doris, Catherine, madame ELISA, smoothy ou Claire). J'étais venu chercher à comprendre la vie des cellules iNKT et je repars en ayant trouvé l'amour. Comme quoi les thèses mènent à tout ! Tout a commencé autour de blagues et de tours de magie et j'espère que l'histoire n'a pas de fin. Je t'aime (même si tu n'es pas PU-PH ;)). Cette thèse est aussi la tienne. Merci également à ta famille pour son accueil et sa générosité.

Xiapi ou Diablo, on t'aimera même si t'es chauve (mais beau)!!

I.	INTRODUCTION :	17
A.	Rappels sur le système immunitaire :	17
B.	Les lymphocytes « innés » B :	18
1.	Les lymphocytes B-1 :	18
2.	Les lymphocytes B de la zone marginale :	19
C.	Les cellules iNKT :	19
1.	Définition des cellules iNKT :	19
2.	Historique de la découverte des cellules iNKT :	19
3.	Sous-catégories de cellules NKT :	20
4.	La molécule CD1d :	21
5.	Localisation :	22
6.	Phénotype :	22
7.	Développement thymique :	24
8.	Sélection positive des cellules iNKT :	27
9.	Sélection négative des cellules iNKT :	28
10.	Les cellules iNKT, des cellules prédestinées ? :	28
11.	À la recherche du ligand endogène des cellules iNKT :	29
12.	Les facteurs importants pour le développement et l'homéostasie des cellules iNKT :	30
13.	Modes d'activation des cellules iNKT :	37
14.	Fonction des cellules iNKT :	40
15.	Thérapie à base de cellules iNKT :	49
16.	Conclusions :	49
D.	Les cellules MAIT :	50
1.	Historique et définition :	50
2.	MR1 et les ligands des cellules MAIT :	51
3.	Phénotype et localisation :	51
4.	Développement des cellules MAIT :	52
5.	Facteurs importants pour le développement et l'homéostasie des cellules MAIT :	53
6.	Rôle des cellules MAIT :	54
E.	Les cellules T $\gamma\delta$ :	56
1.	Généralités :	56
2.	Localisation des cellules T $\gamma\delta$ :	56

3.	Développement des cellules $\gamma\delta$ :	57
4.	Facteurs importants pour le développement des cellules T $\gamma\delta$ :	57
5.	Modes d'activation :	57
6.	Fonctions :	58
F.	Autres lymphocytes T innés :	59
1.	Les cellules NKT $\gamma\delta$ murines :	59
2.	Cellules T CD8 <sup>+</sup> restreintes par H2-M3 chez la souris :	59
3.	Cellules T CD4 <sup>+</sup> sélectionnées par des interactions thymocyte/thymocyte :	60
4.	Lymphocytes Intra-épithéliaux CD8 $\alpha\alpha$ :	61
5.	Cellules T CD8 <sup>+</sup> innées chez la souris ITK KO :	61
G.	Les déficits immunitaires primitifs : intérêt pour l'étude des composants du système immunitaire :	63
H.	Le syndrome de Purtilo ou syndrome lymphoprolifératif lié à l'X (XLP) :	64
1.	Historique :	64
2.	Le XLP de type 1 (XLP-1) causé par des mutations dans <i>SH2D1A</i> :	64
3.	Le XLP de type 2 (XLP-2) causé par des mutations dans <i>XIAP</i> :	67
I.	L'apoptose :	68
1.	Généralités :	68
2.	Les caspases, les molécules effectrices de l'apoptose :	69
3.	Les deux voies de déclenchement de l'apoptose :	70
4.	Apoptose dans le système immunitaire périphérique :	72
5.	La régulation de l'apoptose :	73
6.	Fonctions non apoptotiques des IAP :	76
7.	La souris déficiente en XIAP :	78
II.	RESULTATS :	82
A.	Mise en évidence du caractère pro-apoptotique des cellules iNKT chez l'homme, rôle de XIAP et rôle du facteur de transcription PLZF :	82
1.	Réduction du nombre de cellules iNKT chez les patients XLP :	82
2.	Mise en évidence du caractère apoptotique des cellules iNKT :	85
3.	Les cellules iNKT ayant subi une expansion <i>in vitro</i> sont plus sensibles à l'apoptose que des cellules T conventionnelles ayant subi une expansion :	86
4.	Les cellules iNKT <i>ex vivo</i> sont aussi plus sensibles à l'apoptose que les cellules V $\beta$ 2 :	93
5.	XIAP régule le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT :	94
6.	Expression augmentée de protéines pro-apoptotiques dans les cellules iNKT :	98

7. Le facteur de transcription PLZF est impliqué dans l'acquisition du phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT :	99
8. Les cellules MAIT ont un phénotype pro-apoptotique similaire à celui des cellules iNKT :	104
9. Même si elles sont plus sensibles à l'apoptose que les cellules T $\alpha\beta$ , les cellules T $\gamma\delta$ ne semblent pas être dépendantes de XIAP :	106
B. Les cellules iNKT de souris ont, comme chez l'homme, un phénotype pro-apoptotique mais qui n'est pas régulé par XIAP :	108
C. Un rôle des cellules iNKT dans le contrôle de l'infection par l'EBV chez l'homme :	111
1. L'expression de CD1d est augmentée à la surface des cellules B activées :	111
2. Les cellules iNKT sont activées en présence de cibles exprimant CD1d :	112
3. Modulation de l'expression de CD1d par l'EBV :	114
III. DISCUSSION :	116
A. Mise en évidence du phénotype pro-apoptotique des lymphocytes iNKT et MAIT et de leur dépendance en XIAP :	116
B. De l'intérêt que des cellules innées soient plus sensibles à l'apoptose :	119
C. Comment expliquer ce caractère pro-apoptotique sur le plan moléculaire :	120
D. Phénotype des cellules iNKT résiduelles chez les patients atteints de XLP-2 :	124
E. Rôle des cellules iNKT dans la physiopathologie du XLP-2 :	125
1. Un lien entre EBV et NKT :	125
2. Rôle de la susceptibilité à l'apoptose des cellules iNKT dans la physiopathologie du XLP-2 :	127
F. Rôle de la susceptibilité à l'apoptose des cellules MAIT dans la physiopathologie du XLP-2 :	129
G. Limites des méthodes utilisées :	130
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES :	131
A. Conclusion :	131
B. Perspectives :	132
1. Mise en évidence du rôle des cellules iNKT dans l'infection par l'EBV :	132
2. Les cellules iNKT comme biomarqueur :	133
3. Utilisation thérapeutique des cellules iNKT :	134
V. ANNEXES :	136
A. ANNEXE 1: Les patients XLP-2 hypomorphes ont plus de cellules iNKT et MAIT que les patients n'ayant pas de protéine résiduelle :	136
B. ANNEXE 2 : Méthode de mesure de l'apoptose :	138



C.	ANNEXE 3 : Caractéristiques des contrôles utilisés :.....	140
D.	ANNEXE 4 : Les cellules iNKT sont plus sensibles à l'apoptose que les cellules T conventionnelles :.....	141
E.	ANNEXE 5 : Surexpression de protéines pro-apoptotiques dans les cellules iNKT : .....	142
F.	ANNEXE 6 : Les patients XLP-2 n'ont pas de diminution du nombre de leurs cellules T $\gamma\delta$ : .....	143
G.	ANNEXE 7 : Suivi à long terme de cultures de blastes :.....	144
H.	ANNEXE 8 : Corrélation entre le nombre de cellules iNKT et l'apoptose de blastes de donneurs sains : .....	145
I.	ANNEXE 9 : Phénotype des cellules iNKT résiduelles chez les patients XLP-2 : .....	146
VI.	MATERIELS ET METHODES:.....	147
VII.	BIBLIOGRAPHIE : .....	152
VIII.	ARTICLE soumis à publication :.....	180
IX.	Article sous presse :.....	203

## LISTE DES ABBREVIATIONS UTILISEES :

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ACAD	Activated T Cells Autonomous Death
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
AICD	Activation Induced Cell Death
Apaf-1	Apoptosis Peptidase Activating Factor-1
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine TriPhosphate
BCR	B cell Receptor
BIR	Baculovirus IAP Repeats
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Btk	Bruton Tyrosine Kinase
BZM	B de la zone marginale
CARD	Caspase Activation Recruitment Domain
CDR3	Complementary-Determining Region 3
CEI	Cellules Epithéliales Intestinales
cIAP	Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	CytoMégaloVirus
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DcR	Decoy Receptor
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DN	Double Négative
DP	Double Positive
EAE	Encephalite Experimentale Auto-Immune
EAT-2	Ewing Sarcoma-associated transcript-2
EBV	Epstein Barr Virus
Egr	Early Growth Response
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ERT	EAT-2-related transducer
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FADD	Fas-Associated Death Domain
FH	Follicular Helper
FHL	Lympho-Histiocytoses Familiales
FTOC	Fetal Thymic Organ Cultures
Gb3	globotrihexosylceramide
GFP	Green Fluorescent Protein
GITR	Glucocorticoid-Induced TNFR-Related protein
GNPAT	glyceronephosphate O-acyltransferase
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HLH	Hemophagocytic LymphoHistiocytosis
HMB-PP	(E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-enyl PyroPhosphate
HMT	cellules T CD8+ restreintes par H2-M3
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
IFN	Interféron
iGb3	isoglobotrihexosylceramide
IL-	Interleukin
iNKT	Invariant Natural Killer T
IPP	Isopentenyl PyroPhosphate
ITK	Interleukin-2-inducible T-cell Kinase
JNK	Jun-N-terminal Kinases
KO	Knock Out
LIE	lymphocytes T intraépithéliaux
LRR	Leucin-Rich Repeat

LT $\alpha$	lymphotoxine $\alpha$
LT $\beta$	lymphotoxine $\beta$
MAIT	Mucosal Associated Invariant T
MDSC	Myeloid-Derived Suppressor Cells
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MR1	Major histocompatibility complex class I-related gene protein
NK	Naturel Killer
NKT	Natural Killer T
NLR	Nod Like Receptors
Nrp-1	Neuropilin-1
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PHA	PhytoHaemAgglutinin
PLZF	Promyelocytic Leukemia Zinc-Finger
PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PRR	Pattern Recognition Receptor
RING	Really Interesting New Gene
ROR	Related Orphan Receptor
RTE	Recent Thymic Emigrant
S1P1	Sphingosine 1-Phosphate 1
SAA	Serum Amyloid A
SAP	SLAM Associated Protein
SEP	Sclérose En plaque
Sh-RNA	Small Hairpin RNA
SIMP	Soluble Inter Membrane Mitochondrial Proteins
SLAM-R	Récepteurs de la famille SLAM
TCR	T cell Receptor
TGF	Transforming Growth Factor
TH	T Helper
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TSST-1	Toxic Shock Syndrome Toxine 1
UBA	Ubiquitin Binding
UBC	UBiquitin-Conjugating
VZV	Virus de la varicelle et du zona
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
XIAP	X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein
XLP	syndrome lymphoprolifératif lié à l'X
$\alpha$ GalCer	$\alpha$ -GalactosylCéramide
$\beta$ -GlcCer	$\beta$ -D-glucopyranosylceramide

Figure 1 : Représentation schématique du système immunitaire.....	18
Figure 2 : Structure de l' $\alpha$ GalCer.....	20
Figure 3 : Développement des cellules iNKT murines.....	25
Figure 4 : Développement des cellules iNKT TH17 murines.....	26
Figure 5 : Signalisation proximale du TCR des cellules iNKT. ....	33
Figure 6 : Facteurs importants pour le développement des cellules iNKT.....	37
Figure 7 : Différents modes d'activation des cellules iNKT.....	40
Figure 8 : Inhibition de la cytotoxicité en l'absence de SAP.....	66
Figure 9 : Structure des IAP humaines. ....	74
Figure 10 : Schéma représentant les interactions principales de XIAP.....	78
Figure 11 : Les patients déficients en SAP et XIAP ont une réduction du nombre de leurs cellules iNKT en périphérie.. ....	83
Figure 12 : Le patient P1 a un excès d'apoptose. ....	84
Figure 13 : Le développement des cellules iNKT humaines n'est pas affecté par l'absence de XIAP.. ....	84
Figure 14 : Phénotype des cellules iNKT et V $\beta$ 2 obtenues après expansions <i>in vitro</i> .....	86
Figure 15 : L'AICD des cellules iNKT est supérieure à celle des cellules T V $\beta$ 2 conventionnelles.. ....	88
Figure 16 : L'apoptose médiée par Fas est supérieure dans les cellules iNKT.....	89
Figure 17 : L'apoptose via la voie intrinsèque est également augmentée dans les cellules iNKT.. ....	90
Figure 18 : L'IL-15 permet de réduire partiellement le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT.....	91
Figure 19 : Le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT est déjà présent dans le thymus. .....	92
Figure 20 : <i>Ex vivo</i> , les cellules iNKT sont également plus sensibles à l'apoptose que les cellules T V $\beta$ 2 conventionnelles. ....	94

Figure 21 : Une déficience en XIAP aggrave le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT.	95
Figure 22 : Inhibition de l'expression de XIAP par sh-RNA.	96
Figure 23 : Exacerbation de l'apoptose des cellules iNKT après extinction de XIAP.	97
Figure 24 : Etude de l'expression de molécules pro et anti-apoptotique dans les cellules iNKT.	99
Figure 25 : Modification de l'expression de PLZF.	100
Figure 26 : Le facteur de transcription PLZF contrôle le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT.	101
Figure 27 : PLZF contrôle le phénotype pro-apoptotique des cellules T.	103
Figure 28 : Les patients XLP-2 ont un nombre réduit de cellules MAIT.	104
Figure 29 : Les cellules MAIT ont comme les cellules iNKT un phénotype pro-apoptotique.	105
Figure 30 : XIAP et PLZF régulent l'apoptose des cellules MAIT.	106
Figure 31 : Apoptose <i>ex vivo</i> de splénocytes de souris.	108
Figure 32 : La souris XIAP KO ne présente pas de défaut du compartiment des cellules iNKT.	109
Figure 33 : L'expression de CD1d est augmentée sur des cellules B activées.	111
Figure 34 : Activation des cellules iNKT en présence de lymphocytes B Raji présentant de l' $\alpha$ GalCer via CD1d.	113
Figure 35 : L'expression de CD1d est diminuée en présence de l'EBV.	114
Figure 36 : Schéma récapitulatif du développement et de l'homéostasie des cellules iNKT humaines.	124
Figure 37 : Les patients hypomorphes ont plus de cellules iNKT que les patients n'exprimant pas de protéine résiduelle.	136
Figure 38 : Les patients hypomorphes ont plus de cellules MAIT que les patients n'exprimant pas de protéine résiduelle.	136
Figure 39 : Représentation schématique de la protéine XIAP.	137

Figure 40 : Méthode d'évaluation de l'apoptose cellulaire.....	138
Figure 41 : Figures représentatives de FACS montrant la stratégie utilisée pour la détection de l'apoptose.. .....	139
Figure 42 : L'apoptose de cellules iNKT est supérieure à celle de cellules CD8 <sup>+</sup> spécifiques du CMV ou de blastes PHA. ....	141
Figure 43 : Les patients XLP-2 ne présentent pas de réduction de leur nombre de cellules T $\gamma\delta$ .....	143
Figure 44 : Apoptose <i>ex vivo</i> de PBMC.. .....	143
Figure 45 : Suivi à long terme de culture de blastes.....	144
Figure 46 : AICD sur blastes des différents donneurs.....	145
Figure 47 : L'expression de CD161 peut être diminuée sur les cellules de patients XLP-2..	146

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes populations de cellules NKT. ....	21
Tableau 2 : Localisation des cellules iNKT .....	22
Tableau 3: Comparaison des propriétés des cellules iNKT et des cellules T conventionnelles. .....	50
Tableau 4 : Mutations et nombre de cellules iNKT et MAIT associés aux patients XLP-2 hypomorphes. ....	137
Tableau 5 : Caractéristiques des donneurs testés dans l'étude.....	140
Tableau 6 : Quantification de la surexpression de protéines pro-apoptotiques dans les cellules iNKT. ....	142
Tableau 7 : Nombre de cellules iNKT, MAIT et T $\gamma\delta$ des donneurs avant stimulation par de la PHA.....	144
Tableau 8 : Nombre de cellules iNKT et de cellules MAIT pour les donneurs.....	145



## **I. INTRODUCTION :**

### **A. RAPPELS SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE :**

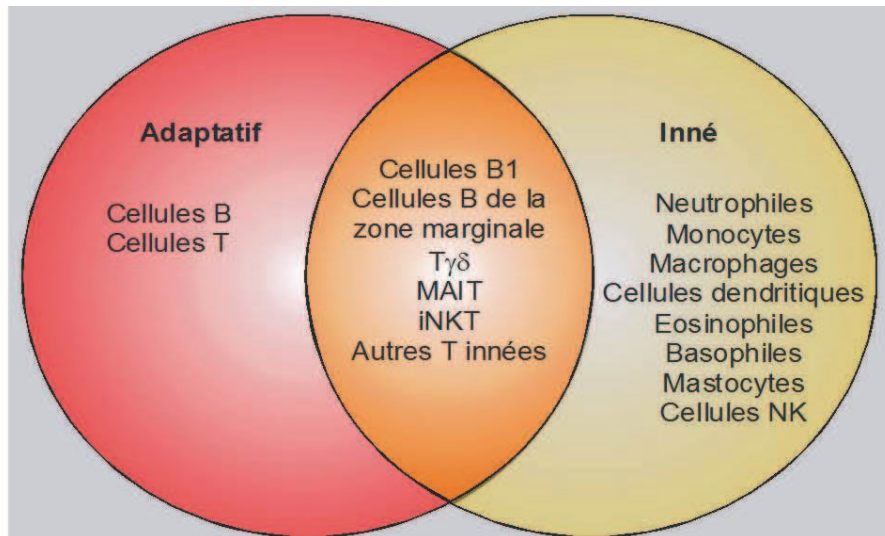
Le système immunitaire est un système veillant à l'intégrité du soi. Les cellules et les molécules qui le composent sont capables de reconnaître et d'éliminer une variété a priori illimitée d'agents pathogènes. Afin d'assurer cette fonction, différents acteurs, appartenant à deux grandes catégories, l'immunité innée et l'immunité adaptative, interviennent.

Les composants de l'immunité innée constituent la première ligne de défense vis-à-vis des pathogènes. Cette défense est mise en jeu rapidement, et fait intervenir des mécanismes peu spécifiques du pathogène. Les principaux acteurs de ce système sont les cellules intervenant dans la phagocytose (polynucléaires neutrophiles, monocytes/macrophages, cellules dendritiques), les polynucléaires éosinophiles, les polynucléaires basophiles, les mastocytes, des composants humoraux comme le système du complément, ou encore les lymphocytes NK (Natural Killer) capables de lyser des cellules infectées par des virus notamment.

En parallèle se met en action le système immunitaire adaptatif : celui-ci permet une réponse plus efficace contre le pathogène, car elle est beaucoup plus spécifique, bien que plus longue à se mettre en place lors d'un premier contact. De plus, le système adaptatif a la capacité de générer une mémoire immunologique : en cas de seconde rencontre avec un même pathogène la réponse spécifique sera plus rapide. Cette immunité adaptative fait intervenir les lymphocytes B, dont la différenciation permettra la sécrétion des anticorps (immunité humorale), et les lymphocytes T, supports de l'immunité à médiation cellulaire.

Si la plupart des cellules du système immunitaire peuvent être classées de manière simplifiée comme faisant partie du système inné ou du système adaptatif, cette distinction est beaucoup moins claire pour certains types cellulaires. On parle alors de lymphocytes T et B innés (figure 1). Ces cellules regroupent les cellules B-1, les cellules B de la zone marginale, les cellules T  $\gamma\delta$ , les cellules *Mucosal Associated Invariant T* (MAIT) et les cellules *invariant Natural Killer T* (iNKT). Chacune de ces cellules exprime un récepteur à l'antigène spécifique des cellules B (BCR) ou des cellules T (TCR), ces récepteurs étant générés par une recombinaison dite V(D)J. Cependant, la diversité du répertoire de ces lymphocytes innés est limitée. En ce sens, leur BCR ou TCR se rapproche des « *pattern-recognition receptors* » (PRR) des cellules innées (*Toll Like Receptors* (TLR) ou *Nod Like receptors* (NLR) par

exemple)<sup>1</sup>. De plus, ces cellules ont en commun certaines propriétés : elles ont une mémoire naturelle c'est-à-dire qu'elles n'ont pas de phénotype naïf, elles ont rapidement des fonctions effectrices, et de manière surprenante elles peuvent être autoréactives, c'est-à-dire qu'elles sont capables de reconnaître des antigènes du soi.



**Figure 1 : Représentation schématique du système immunitaire.** Le système immunitaire se divise entre système adaptatif et système inné. Néanmoins, certaines cellules sont à la jonction des deux. Toutes les illustrations de la partie Introduction ont été réalisées par Jean-Pierre Laigneau, IRNEM IFR 94.

## **B. LES LYMPHOCYTES « INNÉS » B :**

### **1. Les lymphocytes B-1 :**

La réponse humorale adaptative aboutit à la production d'anticorps spécifiques d'un antigène après un processus de maturation faisant intervenir notamment la commutation de classe et la maturation d'affinité. Il existe cependant des anticorps « naturels », produits de façon préalable à la rencontre avec l'antigène. Des travaux ont montré qu'il existe un répertoire de ces anticorps naturels dès la naissance, qu'ils sont majoritairement auto-réactifs et que d'autres reconnaissent des motifs conservés des agents pathogènes. Le rôle de ces anticorps naturels pourrait être de fournir une première ligne de défense contre certains pathogènes<sup>2</sup>. Chez la souris, il existe une population particulière de lymphocytes B, dite B1, qui est la source de ces anticorps naturels. Récemment a été identifiée chez l'homme une population de lymphocytes B  $CD20^+CD27^+CD43^+CD70^-$  ayant des caractéristiques communes avec les B1 murines, et capables de sécréter des IgM de façon spontanée<sup>3</sup>.

## **2. Les lymphocytes B de la zone marginale :**

Une autre population lymphocytaire B particulière est celle des lymphocytes B de la zone marginale (BZM). En effet, ces cellules expriment le marqueur mémoire CD27, mais n'ont pas subi la commutation de classe et expriment des IgM de surface. Cependant, les BZM ont, comme les lymphocytes B mémoires switchés, des mutations somatiques dans les régions variables des gènes des immunoglobulines<sup>4</sup>. Ces cellules sont à l'origine de la sécrétion des IgM anti-polysaccharidiques.

Hormis ces deux populations B, il y a plusieurs populations T ayant des caractéristiques innées.

### **C. LES CELLULES iNKT :**

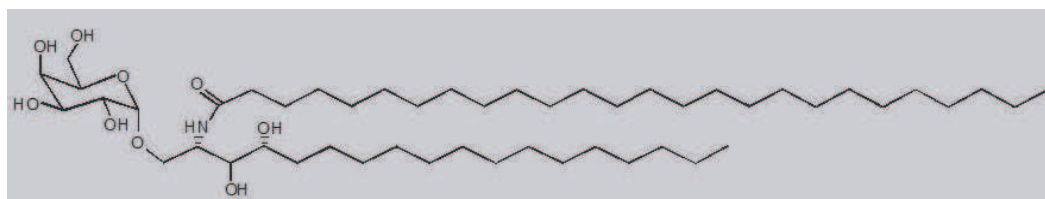
#### **1. Définition des cellules iNKT :**

Les cellules iNKT sont le plus simplement définies comme étant des cellules T  $\alpha\beta$  exprimant des récepteurs de la famille NK et ayant un TCR  $\alpha\beta$  semi-invariant restreint par la molécule du CMH de classe I non classique CD1d. Ce TCR porte un réarrangement V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18/V $\beta$ 11 chez l'homme et V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18/V $\beta$ 8, V $\beta$ 7 et V $\beta$ 2 chez la souris.

#### **2. Historique de la découverte des cellules iNKT :**

Plusieurs études ont permis l'identification des cellules iNKT comme une sous-population de cellules T. Les premières études ont rapporté l'identification d'un réarrangement canonique V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18, dans des hybridomes murins et dans des extraits d'organes lymphoïdes murins<sup>5,6</sup>. Puis ont été identifiées une population murine de lymphocytes T CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> dite double négative (DN) présentant un biais de réarrangement V $\beta$ 8<sup>7</sup> et une population humaine DN présentant un réarrangement V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18<sup>8</sup>. Il a ensuite été montré que ces cellules identifiées chez la souris et chez l'homme expriment des récepteurs de la lignée NK. Enfin, la première caractérisation de ces cellules a été obtenue quand plusieurs études ont établi qu'elles reconnaissent la molécule non classique du CMH de classe I CD1d<sup>9,10</sup>. Il a été rapidement montré que ces cellules peuvent être autoréactives<sup>11</sup>. Le premier ligand identifié pour les cellules iNKT a été trouvé lors d'un crible de composés naturels ayant des propriétés anti-cancéreuses par Kirin pharmaceuticals. Des extraits d'*Agelas mauritanus*, une éponge marine récoltée dans la baie d'Okinawa, ont été injectés à des souris porteuses de cellules de mélanomes de la lignée B16. Cela a permis d'augmenter la

survie des souris<sup>12</sup>. Le composé actif fut identifié comme un galactosylcéramide. Ce composé fut optimisé pour obtenir le composé KRN7000, plus communément appelé  $\alpha$ -galactosylcéramide ( $\alpha$ GalCer) (figure 2). Il a ensuite été mis en évidence que les cellules répondant à ce réactif étaient les cellules iNKT. La découverte de ce ligand a révolutionné l'étude des cellules iNKT. Il a ainsi été possible de créer des tétramères de CD1d- $\alpha$ GalCer pour permettre la détection des cellules iNKT murines ou humaines par cytométrie de flux (FACS), les cellules iNKT humaines reconnaissant également ce ligand.



**Figure 2 : Structure de l' $\alpha$ GalCer.** L' $\alpha$ GalCer est un galactosylcéramide qui a été extrait de l'éponge marine. Il s'agit du premier ligand identifié des cellules iNKT.

### 3. Sous-catégories de cellules NKT :

D'autres catégories de populations NKT ont été identifiées en se basant sur la co-expression d'un TCR et de marqueurs de la famille NK. Ces populations peuvent être CD1d-dépendantes (type II) ou indépendantes (NKT-like) et peuvent avoir un TCR variable. Le tableau ci-dessous résume les différences entre les principales populations de cellules NKT identifiées à ce jour<sup>13</sup>.

Parmi les cellules NKT-like, on retrouve les cellules MAIT dont il sera question plus loin. Les cellules NKT de type II reconnaissent aussi des glycolipides présentés par CD1d et ont des activités immunomodulatrices<sup>14</sup>. La plupart des cellules NKT de type II reconnaissent un lipide endogène, le sulfatide<sup>15</sup>. Par ailleurs, cette classification des cellules iNKT est amenée à évoluer, comme le montre l'identification chez la souris d'une population présentant un TCR semi-invariant V $\alpha$ 10-J $\alpha$ 50 reconnaissant de l' $\alpha$ GalCer présenté par CD1d<sup>16</sup>. Néanmoins, le sous-type le plus étudié est celui des NKT de Type I, appelé aussi iNKT. Par la suite, on ne traitera que des cellules iNKT.

	Type I ou cellules iNKT	Type II	Cellules NKT-like	
			Cellules MAIT	Autres
CD1d-dépendant	Oui	Oui	Non	Non
Reconnaît l'αGalCer	Oui	Non	Non	Non
Chaîne α	Vα24-Jα18 (homme) Vα14-Jα18 (souris)	Variée, mais population murine Vα3.2-Jα9, Vα8	Vα7.2-Jα33 (homme) Vα7.2-Jα33 (souris)	Variée
Chaîne β	Vβ11 (homme) Vβ8.2, Vβ7, Vβ2 (souris)	Variée, mais population murine Vβ8.2	Vβ13.1, Vβ13.3 et Vβ2 (homme) Vβ6 et Vβ8 (souris)	Variée
CD161 (NK1.1 chez la souris)	+/-	+/-	+	+
CD4/CD8	CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> ou DN (homme) CD4 <sup>+</sup> ou DN (souris)	CD4 <sup>+</sup> et DN (souris)	CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> et DN	CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> et DN
Production d'IL-4	Oui	Oui	Non	Non
Production d'IFN-γ	Oui	Oui	Oui	Oui

**Tableau 1 : Caractéristiques des différentes populations de cellules NKT.**

#### **4. La molécule CD1d :**

CD1d est une molécule non polymorphique non classique du CMH de classe I qui présente des lipides aux cellules iNKT. La famille CD1 compte 5 membres chez l'homme (CD1a-e) alors que la souris n'exprime que deux homologues de CD1d, CD1d1 et CD1d2. La molécule CD1d est très conservée chez les mammifères<sup>17</sup>. Elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique où elle s'associe à une protéine de transfert qui aide probablement au chargement d'un lipide endogène avant l'export à la surface cellulaire<sup>18,19</sup>. Une fois à la surface, la molécule CD1d est recyclée à travers le système endolysosomal où elle interagit avec des protéines du lysosome comme des saposines, qui permettent le chargement d'antigènes exogènes au sein de la molécule de CD1d<sup>20</sup>. Bien que la molécule CD1d ne soit pas polymorphique, elle peut fixer et présenter différents ligands grâce à une poche de fixation large et profonde<sup>21</sup>. La molécule CD1d est exprimée de manière constitutive sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les cellules dendritiques, les cellules B et les macrophages<sup>22,23</sup>. L'expression de CD1d n'est que modérément modifiée suite à des stimulations par les TLR ou des cytokines inflammatoires<sup>24</sup>. La molécule CD1d est aussi exprimée sur les thymocytes (cf. paragraphe sur la sélection positive).

## 5. Localisation :

L'abondance relative des cellules iNKT dans les différents organes est indiquée dans le tableau ci-dessous<sup>25-30</sup>. La proportion des cellules iNKT est similaire dans les différents organes à l'exception du foie et de l'omentum dans lesquels les cellules iNKT s'accumulent. Par ailleurs, les cellules iNKT semblent être cinq à dix fois moins nombreuses chez l'homme que chez la souris. Enfin, le nombre de cellules iNKT dans le sang chez l'homme peut varier d'un facteur 1000 entre différents individus allant de 20 à 20000 cellules iNKT par million de cellules T CD3<sup>+</sup>. Les facteurs responsables de ces différences individuelles ne sont pas connus pour le moment.

Localisation	Souris	Homme
Thymus	0,5 % des thymocytes	0,001 % des thymocytes
Moelle osseuse	0,5 % des cellules T CD3 <sup>+</sup>	0,1 % des cellules T CD3 <sup>+</sup>
Ganglions lymphatiques	0,5 % des cellules T CD3 <sup>+</sup>	0,1 % des cellules T CD3 <sup>+</sup>
Sang	0,5 % des cellules T CD3 <sup>+</sup>	0,1 % des cellules T CD3 <sup>+</sup>
Rate	2,5 % des cellules T CD3 <sup>+</sup>	0,25 % des cellules T CD3 <sup>+</sup>
Foie	Jusqu'à 30 % des cellules T CD3 <sup>+</sup>	1 % des cellules T CD3 <sup>+</sup>
Poumons	1 % des cellules T CD3 <sup>+</sup>	0,5 % des cellules T CD3 <sup>+</sup>
Omentum	??	30 à 40% des cellules T CD3 <sup>+</sup>

**Tableau 2 : Localisation des cellules iNKT.** Répartition des cellules iNKT dans différents organes chez la souris et l'homme.

## 6. Phénotype :

### a) Souris :

En périphérie, les cellules iNKT ont un phénotype mémoire, exprimant de façon constitutive CD44, et expriment le marqueur d'activation CD69. Elles sont soit CD4<sup>+</sup>, soit DN. Les cellules iNKT expriment aussi différents marqueurs de la famille NK comme NK1.1, CD122, NKG2D, NKG2A, Ly49-A, Ly49-C/I et Ly49-G2<sup>25</sup>, le profil d'expression des récepteurs NK variant selon les tissus<sup>31</sup>. Chez la souris, les cellules iNKT n'apparaissent pas avant la deuxième semaine de vie et sont en périphérie déjà capables de produire de l'IL-4 et de l'IFN- $\gamma$  grâce à la mise en place au cours de leur développement d'un programme

transcriptionnel résultant en une dérèglement épigénétique des loci codant pour les deux cytokines<sup>32</sup>.

### **b) Homme :**

Chez l'homme, les cellules iNKT en périphérie ont un phénotype mémoire, expriment constitutivement CD45RO et n'expriment pas CD62L. Elles sont négatives pour les marqueurs CD69 et HLA-DR et expriment CD122<sup>33</sup>. Les cellules iNKT humaines peuvent être CD4<sup>+</sup>, DN ou CD8<sup>+</sup>. Enfin, les cellules iNKT humaines expriment aussi des marqueurs de la famille NK comme CD161, CD56, CD16, NKG2A, NKG2D, CD2 et DNAM-1<sup>34,35</sup>. Contrairement aux cellules iNKT murines, les cellules iNKT humaines sont détectables avant la naissance<sup>36</sup>. Les cellules iNKT néonatales ont un phénotype similaire aux cellules iNKT adultes, mais elles expriment aussi le marqueur d'activation récente CD25. De même que chez la souris, les cellules iNKT mettent en place au cours de leur développement un programme transcriptionnel résultant en une dérèglement épigénétique des loci codant pour l'IL-4 et l'IFN- $\gamma$ <sup>37</sup>.

Même si cette propriété n'est pas considérée comme leur principale activité, les cellules iNKT humaines et murines sont aussi capables de fonctions cytotoxiques<sup>34</sup>. Chez les deux espèces, la population CD4<sup>+</sup> est la population majoritaire. Ceci peut paraître surprenant sachant que le TCR reconnaît une molécule de classe I. Néanmoins, une étude a montré que la molécule CD4 peut aussi lier la molécule CD1d et que cette liaison augmente l'activation des cellules iNKT<sup>38</sup>. Néanmoins, même en l'absence de CD4, les cellules iNKT se développent normalement<sup>10</sup>. Bien que le rôle du corécepteur CD4 ne soit pas bien compris, il semble que les différentes catégories de cellules iNKT soient fonctionnellement différentes. Ainsi, les cellules iNKT humaines CD4<sup>+</sup> ont un profil T *Helper* (TH)0 (IL-4 et IFN- $\gamma$ ) alors que les cellules CD4<sup>-</sup> ont un profil TH1 (IFN- $\gamma$ )<sup>39,40</sup>. Même si on ne retrouve pas cette différence de production de cytokines chez la souris, il semble que la population CD4<sup>-</sup> ait des propriétés anti-tumorales plus importantes que la population CD4<sup>+</sup><sup>41</sup>.

De plus, les cellules iNKT des deux espèces expriment des récepteurs de la famille NK. Même si la relevance physiologique n'est pas clairement établie, il a été montré que dans des cellules iNKT humaines, le récepteur NKG2D peut déclencher *in vitro* une réponse indépendamment du TCR et qu'il peut aussi servir de corécepteur quand le TCR est engagé<sup>35</sup>.



## 7. Développement thymique :

Au cours de la différenciation T, les cellules vont passer par le stade DN et par le stade  $CD4^+CD8^+$  dit double positif (DP). Les cellules DN réarrangent en même temps 3 de leur 4 loci TCR :  $Tcr\beta$ ,  $Tcr\gamma$  et  $Tcr\delta$ . La chaîne  $\beta$  s'associe alors à la chaîne pré- $T\alpha$  sans que le locus  $Tcr\alpha$  ne soit réarrangé<sup>42</sup>. Ce pré- $TCR\alpha\beta$  et le TCR  $\gamma\delta$  sont alors exprimés à la surface de la cellule. Si la voie  $\alpha\beta$  est choisie, la cellule va devenir DP et va alors réarranger sa chaîne  $\alpha$ . Le TCR ainsi formé passe alors l'étape de la sélection positive.

### a) Chez la souris :

Une grande avancée dans la compréhension du développement des cellules iNKT a été faite en 2002 par la mise en évidence de cellules iNKT immatures ou matures en fonction de l'expression du marqueur NK1.1 dans le thymus<sup>43-45</sup>. D'ailleurs, certaines cellules iNKT récemment sorties du thymus sont  $NK1.1^-$ , ce qui implique une maturation de ces cellules possible à la fois dans le thymus et en périphérie. L'acquisition du marqueur NK1.1 s'accompagne aussi de l'augmentation de l'expression des marqueurs NK Ly49-C/I, Ly49-G2, Ly49-A et CD122 (chaîne  $\beta$  du récepteur à l'IL-2 et de l'IL-15)<sup>45,46</sup>. Le développement intrathymique des cellules iNKT murines peut se décomposer, une fois la sélection positive faite et le marqueur CD69 acquis, en quatre stades en fonction de l'expression des marqueurs CD24, CD44 et NK1.1. Les stades du plus immature au plus mature sont définis comme tel (figure 3):

Stade 0 :  $CD24^+CD44^-NK1.1^-$

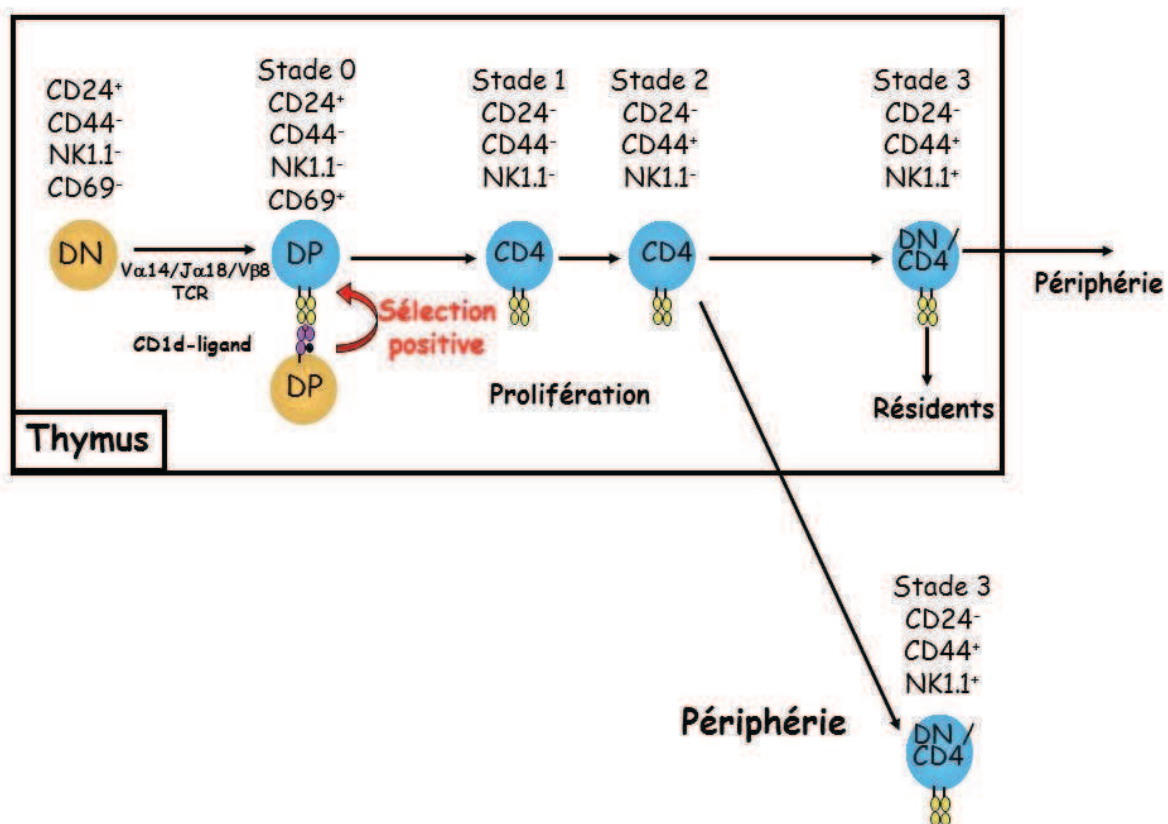
Stade 1 :  $CD24^-CD44^-NK1.1^-$

Stade 2 :  $CD24^-CD44^+NK1.1^-$

Stade 3 :  $CD24^-CD44^+NK1.1^+$

Les cellules au stade 0 sont  $CD4^+$ . Elles sont extrêmement rares (moins de 0,001% des thymocytes) et ne prolifèrent pas. Ensuite, l'expression de CD24 est diminuée (stade 1) et les cellules entrent dans une phase de prolifération intense, amplifiant ainsi le pool de cellules iNKT. En passant au stade 2, les cellules expriment CD44. Enfin, les cellules expriment NK1.1 pour atteindre le stade 3. Ce stade est marqué par une prolifération fortement réduite<sup>47</sup>. A ce stade, les cellules iNKT  $NK1.1^-$  dans le thymus sont fonctionnelles. Néanmoins, leur profil cytokinique est différent puisqu'elles produisent plus d'IL-4 et moins d'IFN- $\gamma$  que les cellules matures  $NK1.1^+$ . Par ailleurs, certaines cellules iNKT restent  $NK1.1^-$  en périphérie

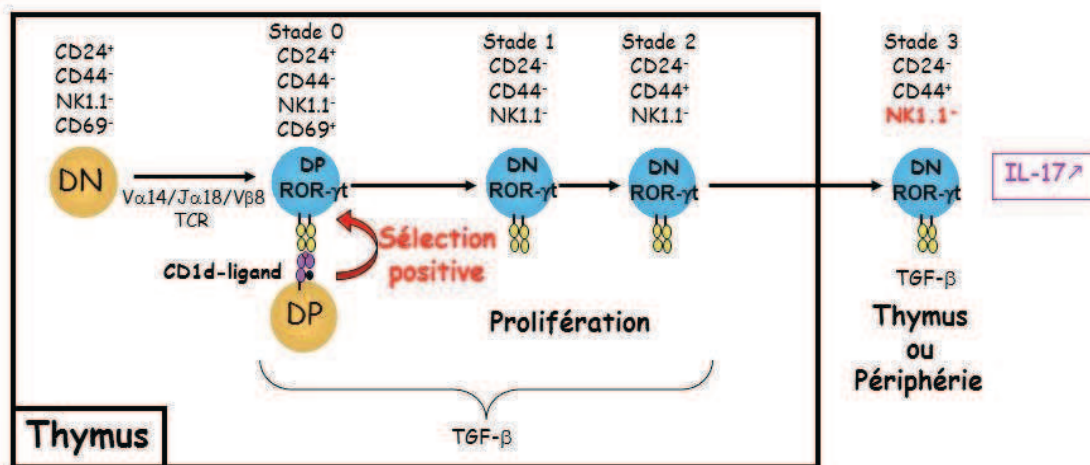
bien qu'étant matures<sup>48</sup>. Les cellules NK1.1<sup>-</sup> venant de quitter le thymus sont appelées iNKT RTE (*recent thymic emigrant*). En 2011, Milpied et al. ont montré que la neuropilin-1 (Nrp-1) est un marqueur de ces cellules<sup>49</sup>. Si les stades 0, 1 et 2 sont clairement thymo-dépendants chez la souris, la plupart des cellules iNKT sortent du thymus avant le stade 3. L'émigration des cellules iNKT du thymus est un phénomène contrôlé par au moins deux récepteurs : le récepteur de la lymphotoxine  $\beta$  (LT $\beta$ )<sup>50</sup> et le récepteur des sphingosine 1-phosphate 1 (S1P1)<sup>51</sup>. Parmi les cellules iNKT subissant le passage au stade 3 dans le thymus, certaines vont y rester constituant des cellules iNKT thymiques résidentes<sup>52</sup>. Leur fonction n'est pas clairement établie.



**Figure 3 : Développement des cellules iNKT murines.** Le développement des cellules iNKT commence dans le thymus et peut se terminer en périphérie. On peut définir 4 stades de développement en se basant sur l'expression des marqueurs CD24, CD44 et NK1.1.

En 2007, Michel et al. ont identifié une sous-population de cellules iNKT murines sécrétant de l'IL-17 et peu d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$ <sup>53</sup>. Ces cellules iNKT ont été appelées iNKT TH17. Elles ont la particularité de ne pas exprimer le marqueur NK1.1 bien qu'étant matures. Par ailleurs, Milpied et al. ont montré que les cellules iNKT produisant de l'IL-17 font partie des cellules iNKT RTE exprimant Nrp-1<sup>49</sup>. Par ailleurs, contrairement aux cellules T classiques TH17, les cellules iNKT TH17 ne dépendent pas de l'IL-6<sup>54</sup>. En 2009, Doisne et al.

ont mis en évidence que les cellules iNKT TH17 murines sont enrichies dans la peau et les ganglions lymphatiques de souris saines<sup>55</sup>. Il a aussi été montré que ces cellules s'accumulent dans les poumons<sup>53</sup>. Cette équipe a trouvé que les cellules iNKT TH17, en plus d'être NK1.1<sup>+</sup>, expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ t. En 2011, Doisne et al. ont démontré que la production d'IL-17 par ces cellules nécessite la présence d'IL-1 et d'IL-23 en plus d'une stimulation de leur TCR. La production d'IL-1 et d'IL-23 dans ce modèle est dépendante des cellules dendritiques stimulées via leur TLR par des ligands ou par des bactéries comme *E. coli* and *S. aureus*. En 2008, le rôle essentiel du facteur de transcription ROR $\gamma$ t a été mis en évidence pour le développement des cellules iNKT TH17<sup>54</sup>. En 2012, il a enfin été montré que les cellules iNKT TH17 ont besoin du TGF- $\beta$  pour leur développement thymique et pour leur fonction en périphérie. La voie principalement utilisée est celle dépendante de Smad4<sup>56</sup>. Comme le montre la figure 4, le TGF- $\beta$  et l'expression de ROR $\gamma$ t sont nécessaires dans le thymus et en périphérie pour pouvoir générer des cellules iNKT TH17.



**Figure 4 : Développement des cellules iNKT TH17 murines.** Le développement des cellules iNKT TH17 se fait de la même manière que celui des cellules iNKT. Néanmoins, ces cellules n'acquièrent pas de marqueur CD4 ou NK1.1 et ont besoin de ROR $\gamma$ t et de TGF- $\beta$  pour leur développement et leur fonctionnement.

Par ailleurs, pour les cellules iNKT classiques et pour les cellules iNKT TH17, le passage par un stade DP lors du développement a clairement été montré en utilisant des modèles de souris transgéniques<sup>57</sup>. De manière intéressante, dans cette étude de 2005, on peut voir l'existence d'une population de cellules iNKT exprimant ROR $\gamma$ t. Ces cellules correspondent aux cellules iNKT TH17 qui n'ont été identifiées en 2007.

## **b) Chez l'homme :**

Les cellules iNKT humaines suivent une voie de différenciation similaire avec un stade 3 de différenciation qui se fait uniquement en périphérie. Les cellules iNKT humaines quittent donc le thymus à l'état  $CD4^+CD161^-$  et terminent leur maturation en périphérie où elles acquièrent le marqueur CD161 et peuvent devenir CD8 ou DN<sup>28,58</sup>. Contrairement aux cellules iNKT murines qui sortent du thymus fonctionnelles, les cellules iNKT humaines, bien qu'ayant un phénotype mémoire ( $CD45RO^+CD62L^-$ ), ne sont pas tout à fait fonctionnelles. Ainsi, des cellules iNKT issues de sang de cordon nécessitent deux stimulations *in vitro* pour produire de l'IL-4 ou de l'IFN- $\gamma$ <sup>33</sup> alors même qu'elles en ont déjà des transcrits et que les promoteurs de ces cytokines sont déméthylés<sup>37</sup>. Il existe donc une étape de maturation en périphérie qui permet aux cellules iNKT de répondre rapidement en sécrétant des cytokines comme l'IL-4 ou l'IFN- $\gamma$ . Enfin, il n'a pas été formellement mis en évidence de cellules iNKT résidentes dans le thymus humain<sup>25</sup>.

Chez l'homme, des cellules iNKT TH17 ont aussi été identifiées. Ces cellules font partie d'une sous-population de cellules iNKT  $CD161^+CD4^-$ . Elles nécessitent néanmoins un environnement inflammatoire puisque la production d'IL-17 est dépendante de la présence de TGF- $\beta$ , d'IL-1- $\beta$  et d'IL-23. Les cellules iNKT TH17 sont aussi capables de produire de l'IL-22 chez la souris<sup>59</sup> ou chez l'homme<sup>60</sup>.

## **8. Sélection positive des cellules iNKT :**

La sélection positive des cellules T conventionnelles nécessite la reconnaissance par le TCR d'un complexe CMH de classe I ou II et d'un peptide présenté par une cellule épithéliale corticale du thymus. Les cellules iNKT reconnaissent par leur TCR un glycolipide présenté par une molécule de CD1d sur une cellule DP et non pas par une cellule épithéliale corticale. Plusieurs expériences de chimères ont établi ce résultat en montrant que l'expression de CD1d est requise sur les cellules DP et non pas sur les cellules corticales<sup>61,62</sup>. De manière surprenante, les cellules épithéliales corticales thymiques expriment aussi la molécule CD1d<sup>63</sup>. Pourtant, elles ne sont pas capables de soutenir le développement des cellules iNKT. Deux hypothèses peuvent expliquer ce constat : les cellules corticales ne peuvent pas donner de signaux supplémentaires fournis par les cellules DP, ou alors les cellules corticales ne sont pas capables de présenter le ligand nécessaire à la sélection des cellules iNKT. Par ailleurs, la seule présence de CD1d à la surface des cellules DP n'est pas suffisante pour avoir une sélection des cellules iNKT. La molécule de CD1d a besoin d'être recyclée à travers les

endosomes intracellulaires ou la voie lysosomale<sup>25</sup>. En l'absence de recyclage et même si la molécule de CD1d peut être exprimée à la surface des cellules DP, la sélection des cellules iNKT est quasiment abolie<sup>64</sup>. Cela indique que la sélection positive nécessite vraisemblablement le chargement d'un lipide endogène d'origine lysosomale ou endosomale.

### **9. Sélection négative des cellules iNKT :**

Les cellules iNKT subissent probablement une étape de sélection négative<sup>47</sup>. En effet, durant les premières étapes de leur développement, les cellules iNKT expriment le facteur de transcription Nur77, facteur qui est associé à la sélection négative dans les cellules T conventionnelles<sup>65</sup>. Des expériences complémentaires tendent également à mettre en évidence une sélection négative. La mise en présence de *Fetal Thymic Organ Cultures* (FTOC) avec de l' $\alpha$ GalCer conduit à la perte des cellules iNKT dans la culture<sup>66</sup>. Par ailleurs, la surexpression de CD1d spécifiquement sur les cellules dendritiques, cellules fortement impliquées dans la sélection négative, conduit à une diminution des cellules iNKT en périphérie et à une réactivité atténuée des cellules suite à la stimulation de leur TCR<sup>67</sup>. L'expérience miroir avec un modèle de souris qui n'exprime CD1d que sur les thymocytes conduit à l'apparition de cellules iNKT en périphérie qui sont plus actives que des cellules iNKT d'une souris sauvage<sup>68</sup>.

### **10. Les cellules iNKT, des cellules prédestinées ? :**

Deux modèles ont initialement été proposés pour le développement des cellules iNKT. Le premier modèle suggérerait l'existence de précurseurs voués à devenir des cellules iNKT et, ce, avant l'expression du TCR. Selon la deuxième théorie, les précurseurs T ne deviennent des cellules iNKT que lorsque le réarrangement adéquat a été obtenu et que la cellule a été sélectionnée par la rencontre avec le(s) ligand(s) endogène(s) thymique(s) des iNKT. Le premier modèle se basait sur une étude montrant l'existence d'un réarrangement V $\alpha$ 14 canonique à 9.5 jours de gestation chez la souris, bien avant la formation du thymus<sup>69</sup>. Néanmoins, cette observation n'a pas pu être reproduite avec l'utilisation d'un tétramère de CD1d. Le deuxième modèle est aujourd'hui communément accepté. En effet, alors que les cellules iNKT expriment toujours la chaîne V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18, leur allèle non transcrit de la chaîne  $\alpha$  présente des recombinaisons aléatoires<sup>70</sup>. De plus, même si la région *complementary-determining region 3* (CDR3) des cellules iNKT est invariante d'un point de vue des acides aminés, la séquence des nucléotides est variable<sup>71</sup>. Ces données indiquent que le

développement des cellules iNKT se fait dès lors que le réarrangement requis a été produit par hasard et qu'il n'y a pas de cellules prédestinées à devenir des cellules iNKT.

### **11. À la recherche du ligand endogène des cellules iNKT :**

Il a longtemps été pensé que le(s) ligand(s) endogène(s) des cellules iNKT est (sont) un (des) glycosphingolipide(s). Néanmoins, des études ont montré que les cellules iNKT peuvent être stimulées de manière TCR-dépendante par d'autres classes de lipides. De plus, il n'y a pas forcément de conservation des ligands entre l'homme et la souris<sup>72,73</sup>. Les dernières années ont vu le nombre d'études portant sur la recherche du ou des ligands endogènes des cellules iNKT augmenter. L' $\alpha$ GalCer est le ligand le plus fort connu aujourd'hui pour les cellules iNKT. Il n'est cependant pas retrouvé de manière naturelle dans les cellules de mammifères. Néanmoins, ces cellules contiennent de nombreux glycosphingolipides avec une structure proche de l' $\alpha$ GalCer ce qui fait de cette classe de lipides un candidat potentiel. Une étude de Stanic et al. a montré que des cellules de souris déficientes en  $\beta$ -D-glucosyltransférase (et donc déficientes en  $\beta$ -glucosylcéramide, un précurseur nécessaire pour la biosynthèse des glycosphingolipides chez les mammifères) ne sont plus capables de stimuler *in vitro* des hybridomes de cellule iNKT<sup>74</sup>. Une étude ultérieure a pu montrer que des souris déficientes en  $\beta$ -héxosaminidase B, une enzyme lysosomale responsable de la dégradation des globo/isoglobo-glycosphingolipides, conduit à un défaut de développement des cellules iNKT<sup>20</sup>. Cette enzyme produit du globotrihexosylcéramide (Gb3) ou de l'isoglobotrihexosylcéramide (iGb3) dans les lysosomes. Des études successives ont aussi mis en évidence iGb3 comme un candidat sérieux pour la sélection des cellules iNKT<sup>75,76</sup>. Par ailleurs, en étudiant une souris déficiente en  $\alpha$ -Gal-A, une enzyme responsable de la dégradation de l'iGb3, Darmoise et al. ont montré que la dégradation d'iGb3 par cette enzyme empêche l'activation chronique des cellules iNKT *in vivo*. La souris  $\alpha$ -Gal-A KO présente aussi une réduction de ses cellules iNKT due à une stimulation chronique des cellules en périphérie<sup>77</sup>. De plus, l'iGb3 est clairement capable d'activer des cellules iNKT murines ou humaines matures *in vitro* et il a été mis en évidence comme nécessaire pour la réponse des cellules iNKT en réponse à une infection par *Salmonella typhimurium*<sup>78</sup>. Néanmoins, ce rôle central de l'iGb3 a par la suite été remis en question par plusieurs observations. Il a pour le moment été impossible de détecter la présence d'iGb3 dans le thymus, bien que l'on puisse remettre en question la limite de détection de la méthode de chromatographie utilisée<sup>79,80</sup>. De plus, la souris déficiente en iGb3 synthase présente un nombre normal de cellules iNKT<sup>79</sup>.



Cependant, on ne peut pas exclure la possibilité qu'il existe des voies de synthèse alternatives pour la synthèse d'iGb3 et qu'il existe plusieurs ligands pour la sélection des cellules iNKT.

Cette quête du ligand endogène des iNKT est aujourd'hui peut être terminée. En effet, une étude récemment publiée<sup>81</sup> met en lumière le  $\beta$ -D-glucopyranosylcéramide ( $\beta$ -GlcCer). Ce ligand, contrairement à l'iGb3, est retrouvé dans les organes lymphoïdes. De plus, il s'accumule suite à une infection par *E. coli* ou *S. pneumoniae*. Ces observations vont dans le sens d'un rôle physiologique du  $\beta$ -GlcCer pour les cellules iNKT. Il est donc envisageable que le  $\beta$ -GlcCer puisse être également le ligand de sélection des cellules iNKT dans le thymus. Enfin, une étude de cette année a mis en évidence, en fractionnant des extraits thymiques de souris, l'importance de la famille lipidique des glycérophosphates monoalkylés pour le développement des cellules iNKT<sup>82</sup>. Ainsi, des souris déficientes en glycéronéphosphate O-acyltransférase (GNPAT), une enzyme responsable de la synthèse de ce type de lipides, ont un défaut de cellules iNKT avec un blocage de développement au stade 2. On retrouve chez ces souris des cellules iNKT aux stades 0, 1 et 2 en nombre normal voire augmenté. Les glycérophosphates monoalkylés ne sont donc pas nécessaires à la sélection positive des cellules iNKT, mais plutôt au stade final de maturation. Enfin, même si le nombre de cellules iNKT est diminué, des cellules iNKT arrivent à maturer et à sortir en périphérie (environ 40% du nombre de cellules iNKT sauvages). Cette classe de lipides est aussi capable de stimuler *in vitro* des cellules iNKT humaines.

L'ensemble de ces études tend à montrer que les ligands endogènes des cellules iNKT sont multiples que ce soit pour leur développement ou pour leur activation en périphérie. Les cellules iNKT pourraient ainsi avoir besoin d'un ligand pour la sélection positive et d'un autre pour passer les différents stades de maturation.

## **12. Les facteurs importants pour le développement et l'homéostasie des cellules iNKT :**

Les cellules iNKT étant avant tout des cellules T, des facteurs importants pour le développement ou l'homéostasie des cellules T vont l'être aussi pour les cellules iNKT. On peut citer par exemple Lck, Zap-70, Lat, PKC- $\theta$ , ICOS, GATA-3 ou GM-CSF. On retrouvera une description précise de ces facteurs dans la littérature<sup>47,83-86</sup>.

D'autres facteurs sont par contre impliqués spécifiquement dans le développement des cellules iNKT et n'affectent que peu ou pas le développement des lymphocytes T



conventionnels. Toutes les cellules DP doivent avoir un réarrangement de la chaîne  $\alpha$  fonctionnelle afin de poursuivre leur développement. Les premiers réarrangements se font entre des segments  $V\alpha$  et  $J\alpha$  proximaux. En cas de réarrangement non fonctionnel, une deuxième vague de réarrangements entre des segments  $V\alpha$  et  $J\alpha$  plus distaux aura lieu. Le réarrangement  $V\alpha24-J\alpha18$  chez l'homme et  $V\alpha14-J\alpha18$  chez la souris est l'un des réarrangements les plus distaux. Il faut donc des réarrangements secondaires pour obtenir le TCR des cellules iNKT. Par conséquent, le développement des cellules iNKT dépend de facteurs permettant une survie suffisante des cellules DP pour l'établissement de ces réarrangements distaux :

#### **c-Myb :**

c-Myb est un facteur jouant sur la survie des cellules DP. Une étude de 2010 a montré que des souris déficientes en c-Myb ne présentent quasiment pas de réarrangements  $V\alpha14-J\alpha18$  et n'ont donc pas de cellules iNKT<sup>87</sup>. Ce défaut de réarrangement est dû à une durée de vie des cellules DP raccourcie. c-Myb en plus de son rôle dans la survie des cellules DP est aussi nécessaire pour l'expression de CD1d, SLAM, NTBA et SAP (cf. paragraphe plus bas).

#### **HEB et ROR $\gamma$ t :**

ROR $\gamma$ t est nécessaire pour le développement de toutes les cellules iNKT du fait de son rôle dans la survie des cellules DP dans le thymus. En effet, ROR $\gamma$ t induit dans les cellules DP l'expression de Bcl-x<sub>L</sub>, qui permet la survie des cellules DP assez longtemps pour avoir les réarrangements du TCR les plus distaux<sup>88</sup>. Le facteur de transcription HEB est lui aussi important pour la survie des cellules DP puisqu'il contrôle l'expression de ROR $\gamma$ t<sup>89</sup>. Enfin, il a été montré que les cellules iNKT produisant de l'IL-17 dépendent de ROR $\gamma$ t pour leur développement<sup>54</sup>.

Une fois le réarrangement des cellules iNKT obtenu, d'autres facteurs entrent en jeu :

#### **CD1d et la présentation de lipides :**

L'expression de CD1d est bien sûr requise dans le thymus lors de la sélection positive des cellules iNKT. Si l'expression de CD1d est restreinte aux cellules T, les cellules iNKT sont en nombre normal en périphérie mais dans un état moins activé<sup>90</sup>. Cette étude suggère que l'expression de CD1d sur des cellules autres que T est nécessaire pour avoir une maturation complète des cellules iNKT. De même, le transfert de cellules iNKT NK1.1<sup>+</sup> de souris sauvages dans des souris CD1d KO conduit à une maturation incomplète des cellules

iNKT, la plupart des cellules restant NK1.1<sup>91</sup>. CD1d n'est donc pas uniquement requis à l'étape de sélection positive, mais aussi dans des étapes post-sélection, notamment pour l'acquisition du marqueur NK1.1. Enfin, la molécule CD1d est nécessaire à l'homéostasie et au bon fonctionnement des cellules iNKT en périphérie. En effet, chez des patients souffrant de lupus érythémateux systémique, l'expression et le recyclage de la molécule CD1d sont diminués sur les cellules B (ce phénomène est imputable à la présence d'IFN- $\alpha$  dans le sérum de ces patients). Cette diminution s'accompagne d'une réduction du nombre de cellules iNKT et d'une mauvaise réponse des cellules iNKT suite à une stimulation<sup>92</sup>. Par ailleurs, la sélection positive des cellules iNKT nécessite la présentation par CD1d d'un lipide endogène. L'absence du facteur de transcription Bcl11b se traduit par une réduction drastique de cellules iNKT chez la souris. Les auteurs ont pu montrer qu'en plus d'un rôle intrinsèque dans les cellules iNKT, Bcl11b est requis dans les cellules DP pour le métabolisme et la présentation de glycolipides par CD1d<sup>93</sup>.

#### **Voie de signalisation des récepteurs de la famille SLAM (SLAM-R) :**

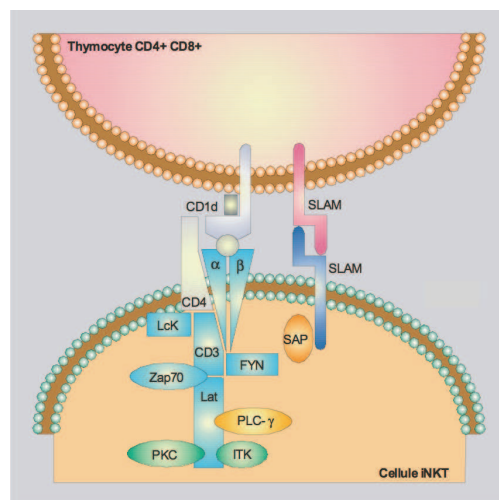
Le mode de sélection des cellules iNKT par des cellules DP plutôt que par des cellules épithéliales corticales s'accompagne de signaux co-stimulateurs que les cellules T conventionnelles ne reçoivent pas. En particulier, les cellules iNKT dépendent fortement de la signalisation des récepteurs SLAM lors de l'étape de sélection positive. Cette signalisation dépend de l'adaptateur SAP qui permet le recrutement de la kinase Fyn. Ainsi, les souris déficientes en SAP et Fyn n'ont aucune cellule iNKT alors que les cellules T conventionnelles sont en nombre normal<sup>94,95</sup>. De manière concordante, les patients déficients en SAP n'ont pas de cellules iNKT (cf. figure 11). En tout cas, la voie SLAM-R/SAP/Fyn n'intervient pas dans le réarrangement du TCR des cellules iNKT. En effet, la fréquence du réarrangement V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 est comparable chez des souris sauvages ou SAP KO<sup>96</sup>. Grâce à des modèles murins, les récepteurs de la famille SLAM importants pour le développement des cellules iNKT ont été identifiés. SLAM et NTB-A sont exprimés sur les cellules DP dans le thymus et soutiennent le développement des cellules iNKT. Le rôle de NTB-A semble plus important que celui de SLAM, puisque la souris NTB-A KO a une réduction de moitié du nombre de cellules iNKT alors que les souris SLAM KO n'a pas de réduction significative du nombre de cellules iNKT. En l'absence des deux récepteurs, le nombre des cellules iNKT est diminué de 95%, et le développement des cellules iNKT est bloqué à l'étape de la sélection positive<sup>96</sup>. Le blocage incomplet en l'absence de ces deux récepteurs peut s'expliquer par un rôle mineur des autres SLAM-R dans le développement des cellules iNKT. Par ailleurs, NTB-A en l'absence de SAP

transmet des signaux négatifs à la cellule. Le développement des cellules iNKT est en effet restauré chez la souris SAP KO si l'on supprime aussi l'expression de NTB-A<sup>97</sup>.

### ITK :

L'*Interleukin-2-inducible T-cell kinase* (ITK) est importante pour la signalisation par le TCR par sa capacité à activer la PLC $\gamma$ -1<sup>98</sup>. Le nombre de cellules iNKT est réduit dans le thymus et en périphérie des souris ITK KO<sup>45</sup>. Une étude des marqueurs d'activation montre un blocage au stade NK1.1<sup>+</sup>. De plus, les cellules iNKT en périphérie sont plus sensibles à l'apoptose<sup>99</sup>. De manière fonctionnelle, l'absence d'ITK se traduit par un blocage de la sécrétion de cytokines suite à une stimulation du TCR, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*<sup>100</sup>. De manière concordante, deux patientes présentant une mutation dans ITK en 2009 ont été décrites par l'équipe d'Arndt Borkhardt<sup>101</sup>. Chez ces deux patientes, les cellules iNKT étaient absentes en périphérie. Ce résultat a par la suite été confirmé chez d'autres patients déficients en ITK<sup>102</sup>.

Une fois le TCR des cellules iNKT obtenu par réarrangement aléatoire, plusieurs molécules participent au complexe de signalisation nécessaire à la sélection positive des cellules dans le thymus (figure 5).



**Figure 5 : Signalisation proximale du TCR des cellules iNKT.** Molécules intervenant dans la signalisation proximale du TCR des cellules iNKT. Illustration réalisée par Jean-Pierre Laigneau, IRNEM IFR 94.

### Flux calcique, Egr1 et Egr2 :

La sélection des cellules T induit de nombreux changements intracellulaires dont une augmentation de la concentration calcique et l'activation de la calcineurine. Celle-ci peut déphosphoryler les membres de la famille NFAT et provoquer leur translocation dans le noyau. La famille des Egr (*early growth response*) fait partie des gènes cibles de NFAT. En

l'absence d'Egr-2, le développement des cellules iNKT est bloqué au stade CD24<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>NK1.1<sup>-103</sup>. L'étude de Seiler et al. a montré en 2012 que l'expression des facteurs Egr1 et Egr2 est plus soutenue dans les précurseurs de cellules iNKT que dans les précurseurs de cellules T conventionnelles<sup>104</sup>.

### **Le facteur de transcription ZBTB16 (aussi appelé PLZF) :**

La famille des protéines BTB-ZF (*Broad complex tramtrack bric-a-brac-Zinc Finger*) est une famille de facteurs de transcription. Ces protéines ont des domaines à doigts de zinc C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> en combinaison avec un domaine N-terminal BTB qui permet des interactions protéine/protéine. La régulation de la transcription se fait par la liaison des motifs à doigts de zinc à des régions régulatrices des gènes cibles, et par le recrutement de cofacteurs par le domaine BTB. Deux groupes ont identifié en 2008 un nouveau régulateur de transcription comme un élément clé du développement des cellules iNKT, le *promyelocytic leukemia zinc-finger* (PLZF ou ZBTB16)<sup>105,106</sup>. PLZF est exprimé par les cellules iNKT dès la sélection positive. L'absence de PLZF bloque les cellules au stade CD24<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>NK1.1<sup>-</sup> et conduit à une réduction drastique du nombre de cellules iNKT dans le thymus, la rate et le foie et à une accumulation dans les ganglions. Les cellules iNKT qui sont tout de même présentes (notamment dans les ganglions) ont un phénotype immature CD44<sup>-</sup>, et produisent moins d'IL-4 et d'IFN-γ. PLZF est donc nécessaire aux stades précoces du développement des cellules iNKT et à l'acquisition du caractère innée des cellules. De manière intéressante, l'expression forcée de PLZF dans des cellules T conventionnelles les transforme en cellules ayant un phénotype mémoire et produisant de l'IFN-γ plutôt que de l'IL-2 suite à leur stimulation<sup>107</sup>. PLZF soutient la production de cytokines, particulièrement la double production d'IFN-γ et d'IL-4 comme pour les cellules iNKT. De manière concordante, un patient récemment décrit avec une perte de fonction bi-allélique de PLZF présente une réduction du nombre de ses cellules iNKT en périphérie<sup>108</sup>. Les facteurs responsables de l'expression de PLZF ne sont pas encore clairement établis mais une étude a montré qu'Egr2 se lie et active le promoteur de PLZF<sup>104</sup>.

### **T-bet et IL-15 :**

Le facteur de transcription T-bet est nécessaire pour la maturation du stade 2 au stade 3<sup>109</sup>. Ce facteur contrôle aussi l'expression de molécules responsables de la migration des cellules iNKT du thymus vers la périphérie et l'augmentation de l'expression de CD122 (chaîne β du récepteur à l'IL-2 et de l'IL-15)<sup>110</sup>. T-bet est également nécessaire à la fonction

cytotoxique des cellules iNKT puisque chez la souris T-bet KO, les cellules iNKT que l'on retrouve tout de même en périphérie ont une expression réduite de FasL et du granzyme B. Ces expressions réduites se traduisent *in vitro* par une capacité moindre à tuer des cibles. De manière remarquable, l'expression d'une forme dominante non active de T-bet dans des cellules iNKT matures ne change pas l'expression de CD122, FasL ou de la granzyme B. T-bet n'agit donc pas comme un facteur de transcription classique qui contrôlerait l'expression de ces molécules, mais plutôt comme un facteur nécessaire pendant le développement des cellules iNKT pour l'initiation d'un programme permettant l'expression de ces molécules.

En 2003, Ranson et al. ont montré par des expériences de transfert que l'IL-15 est nécessaire pour la survie des cellules iNKT en périphérie<sup>111</sup>. Cet effet protecteur de l'IL-15 a été associé en 2011 à un contrôle de l'expression de Bcl-x<sub>L</sub><sup>112</sup>. Par ailleurs, il avait été montré en 2002 que l'IL-15 est une cytokine indispensable à la maturation des cellules iNKT puisque chez la souris IL-15 KO, on observe un blocage de maturation au stade 2<sup>113</sup>. En 2011, Gordy et al. ont montré que l'IL-15 contrôle l'expression thymique de T-bet, ce qui explique le blocage au stade 2 en l'absence d'IL-15<sup>112</sup>.

T-bet et l'IL-15 agissent donc de manière intriquée puisque l'IL-15 permet l'expression de T-bet. Celui-ci permet alors le développement des cellules iNKT et l'augmentation de l'expression de CD122. Cette expression permet alors à l'IL-15 d'avoir un effet protecteur en périphérie qui est médié par Bcl-x<sub>L</sub>.

### **IL-7 :**

Chez la souris IL-7 KO, les cellules iNKT sont retrouvées dans le thymus et en périphérie mais en nombre réduit<sup>114</sup>. Les réarrangements utilisés sont les mêmes que chez une souris sauvage et les cellules iNKT en périphérie ont un phénotype mature, indiquant que l'IL-7 ne semble pas requise pour la sélection positive des cellules iNKT. Il a été montré que l'IL-7 permet la prolifération et la survie des cellules iNKT immatures aux stades 1 et 2<sup>45</sup>. Cependant, même si les cellules iNKT ont un phénotype normal en périphérie chez la souris IL-7 KO, elles ne sont pas capables de produire d'IFN- $\gamma$  ou d'IL-4 que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. L'utilisation d'IL-7 *in vitro* permet de restaurer la capacité de production d'IL-4<sup>115</sup>. Des résultats similaires ont été obtenus pour les cellules iNKT humaines. Des cellules iNKT fœtales ou néonatales subissent en présence d'IL-7 une forte expansion qui s'accompagne d'une maturation, et l'IL-7 est nécessaire pour la production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$ <sup>37</sup>.

### **Lymphotoxines :**

Les lymphotoxines (LT)  $\alpha$  et  $\beta$  sont des membres de la famille du TNF. La LT $\alpha$  peut être sécrétée sous forme d'homotrimère LT $\alpha_3$  qui peut se lier aux récepteurs du TNF I ou II<sup>116</sup>. La LT $\alpha$  peut aussi former un hétérotrimère avec LT $\beta$ , LT $\alpha\beta_2$ , qui lui se lie de manière exclusive au LT $\beta$ R qui est exprimé sur les cellules non lymphoïdes<sup>117</sup>. Une étude de Franki et al. rapporte une diminution des cellules iNKT en périphérie mais pas dans le thymus de souris déficientes en LT $\beta$  ou LT $\beta$ R<sup>50</sup>. Ce défaut est attribué à un rôle des cellules stromales thymiques exprimant LT $\beta$ R dans l'export des cellules iNKT vers la périphérie. Cette même étude et une étude antérieure<sup>118</sup> ont montré que la souris déficiente en LT $\alpha$  présente elle une réduction du nombre de cellules iNKT en périphérie et dans le thymus. Ces résultats indiquent que l'homotrimère de LT $\alpha_3$  est important pour le développement des cellules iNKT dans le thymus.

### **NF- $\kappa$ B :**

Plusieurs membres de la famille NF- $\kappa$ B, bien que non requis pour le développement des cellules T conventionnelles, ont été montrés comme indispensables pour le développement des cellules iNKT<sup>65,119-121</sup>. La dépendance en NF- $\kappa$ B est intrinsèque et extrinsèque aux cellules iNKT. Les membres de cette famille jouent aussi sur les fonctions des cellules iNKT en

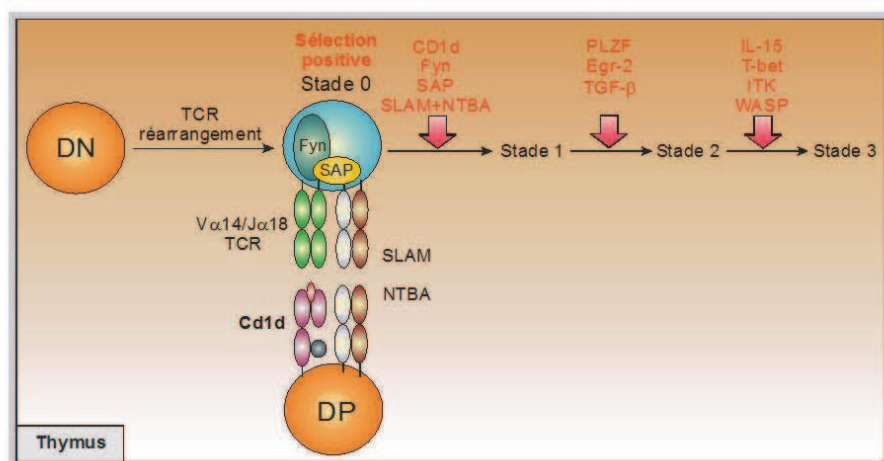
### **WASP :**

La protéine du Wiskott-Aldrich syndrome (WASP) est associée à la polymérisation du cytosquelette d'actine et a été impliquée dans l'immunité avec un rôle dans la migration, la phagocytose et la formation de la synapse immunologique. WASP intervient également dans la signalisation du TCR en s'intégrant dans les complexes de signalisation<sup>122</sup>. Deux études ont montré un défaut de cellules iNKT dans des souris déficientes en WASP. Les cellules iNKT sont moins nombreuses dans le thymus et en périphérie. Il existe un blocage de développement au stade 2. Les cellules iNKT des souris WASP KO ont des niveaux d'intégrines réduits et sont retenues dans les organes périphériques<sup>123</sup>. De plus, elles répondent mal à une stimulation de leur TCR. De manière concordante, les patients souffrant du syndrome de Wiskott-Aldrich n'ont quasiment pas de cellules iNKT en périphérie<sup>124</sup>. WASP intervient donc dans le développement, l'homéostasie et l'activation des cellules iNKT.

## TGF- $\beta$ :

Le TGF- $\beta$  peut agir par au moins trois voies de signalisation : une voie dépendante de Tif1- $\gamma$ , une voie dépendante de Smad4 et une voie indépendante de ces deux facteurs. Chacune de ces voies semble impliquée dans la maturation des cellules iNKT à différents stades. Ainsi, le TGF- $\beta$  par la voie Tif1- $\gamma$ , est nécessaire à la phase d'expansion des cellules iNKT aux stades 1 et 2 de différenciation. Il réprime la transition au stade 3 par la voie indépendante de Tif1- $\gamma$  et de Smad4. Enfin, le TGF- $\beta$  au stade 3 de différenciation induit l'expression de T-bet et de CD122<sup>125</sup>. Enfin, en 2012, il a été montré que les cellules iNKT produisant de l'IL-17 dépendent du TGF- $\beta$  pour leur développement et pour leur fonction en périphérie. La voie principalement utilisée est celle dépendante de Smad4<sup>56</sup>.

La figure 6 ci-dessous récapitule les facteurs les plus importants pour le développement des cellules iNKT.



**Figure 6 : Facteurs importants pour le développement des cellules iNKT.** Sur ce schéma sont représentés des facteurs intervenant pour le développement des cellules iNKT ainsi que le stade de différenciation dans lequel ils sont majoritairement impliqués.

## 13. Modes d'activation des cellules iNKT :

### a) Activation directe des cellules iNKT par des ligands exogènes :

La manière classique d'activer les cellules iNKT est la reconnaissance par leur TCR d'un glycolipide présenté par CD1d. De nombreux lipides exogènes présentés par CD1d aux cellules iNKT ont été identifiés<sup>126,127</sup>. Les cellules iNKT peuvent ainsi reconnaître PIM<sub>4</sub>, un phosphatidylinositol tétramannnosylé provenant de *Mycobacterium bovis*<sup>128</sup>, l' $\alpha$ GalDAG, un



glycolipide dérivé de *Borrelia burgdorferi*<sup>129</sup>, un lipophosphoglycane du parasite *Leishmania donovani*<sup>130</sup>, des alphasphingolipides qui se trouvent dans les bactéries comme *Sphingomonas sp.* et *Ehrlichia sp.*<sup>78,131,132</sup>. Parmi ces derniers, on retrouve l'alpha-galactosylsphingolipide et l'alpha-glucosylsphingolipide. Ces deux molécules possèdent de profondes similarités structurales avec l'alphaGalCer. Il est maintenant admis que l'alphaGalCer est dérivé d'une bactérie de la famille *Sphingomonas sp.* ayant colonisé l'éponge marine *Agelas mauritanus* à partir de laquelle il a été isolé<sup>12</sup>. Les cellules iNKT sont aussi capables de reconnaître le cholesteryl-6-O-acyl alpha-glucoside, lipide dérivé d'*Helicobacter pylori*<sup>133</sup>. Le TCR des cellules iNKT permet également la reconnaissance de glycolipides de bactéries Gram-positives comme *S. pneumoniae* et des *Streptococcus* du groupe B<sup>134</sup>.

#### **b) Activation indirecte des cellules iNKT par un ligand endogène :**

Les cellules iNKT peuvent être activées par des cellules dendritiques qui sont elles-mêmes activées par leur TLR. Cette activation est TCR-dépendante, ce qui indique la reconnaissance d'un ligand endogène présenté par la cellule dendritique aux cellules iNKT. Ainsi, des cellules dendritiques humaines stimulées par les TLR 2, 3, 4, 5, 7 et 8 sont capables d'activer des cellules iNKT de manière CD1d-dépendante. Cette activation est potentialisée par la production d'IL-12 par les cellules dendritiques<sup>135</sup>. Chez la souris, la stimulation du TLR-4 par du LPS ou des TLR-7 ou 9 par des acides nucléiques sur les cellules dendritiques est capable d'activer des cellules iNKT. Par ailleurs, l'activation par le TLR-9 nécessite la production d'IFN- $\alpha$  et la néosynthèse de glycosphingolipides par les cellules dendritiques. D'ailleurs, la stimulation par le TLR-9 induit l'augmentation de l'expression de plusieurs glycosyltransférases impliquées dans la synthèse de glycosphingolipides<sup>136</sup>. Enfin, il a été montré que les cellules iNKT sont activées par des lysophospholipides présentés par CD1d. Ceux-ci sont souvent surexprimés lors de phénomènes d'inflammation<sup>137</sup>. L'ensemble de ces expériences met en lumière la possibilité pour les cellules iNKT d'être activées en l'absence de ligands exogènes.

Les cellules iNKT peuvent ainsi être activées par de nombreux micro-organismes qui ne contiennent pas eux-mêmes de lipides reconnus par le TCR des cellules iNKT. Ce mécanisme d'activation a été montré avec *Salmonella typhimurium* qui exprime du LPS dans sa paroi<sup>138</sup>. Des cellules dendritiques cultivées en présence de cette bactérie sont capables d'induire la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules iNKT. Cette activation est dépendante de l'expression du TLR-4, de CD1d et d'IL-12 par les cellules dendritiques. Cela implique que

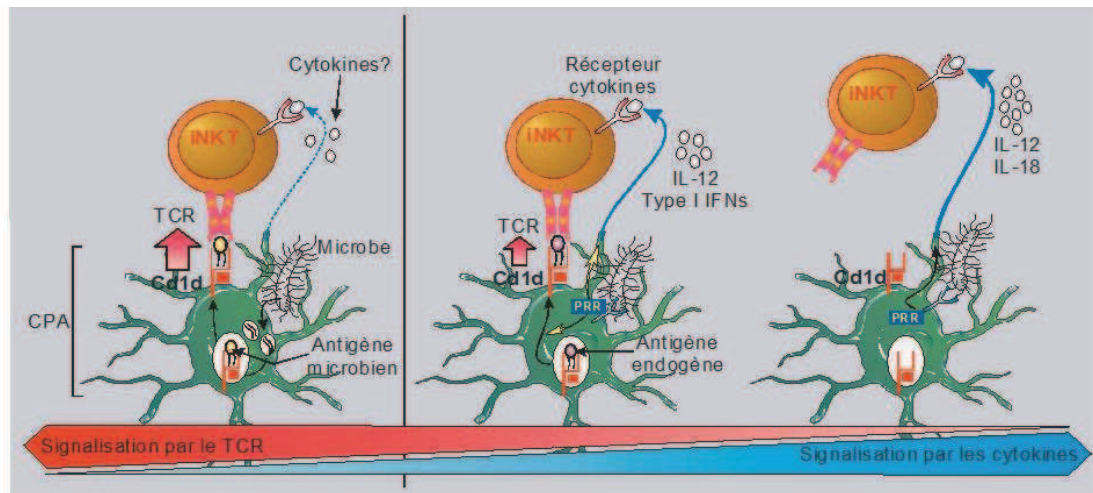


les cellules dendritiques présentent aux cellules iNKT un ligand endogène. De plus, l'IL-12 est nécessaire afin que ce signal via le TCR soit suffisant pour déclencher une réponse par les cellules iNKT. En 2005, il a été montré que cette réponse passe par la présentation de l'iGb3<sup>78</sup>. Les micro-organismes peuvent aussi modifier l'expression de CD1d sur des cellules présentatrices d'antigènes en plus de modifier la production de ligands endogènes. Ce phénomène a clairement été établi pour *Listeria monocytogenes* qui, mise au contact de cellules dendritiques, augmente l'expression de surface de CD1d de manière IFN- $\beta$  dépendante<sup>139</sup>. Plusieurs études ont aussi mis en évidence que différents ligands des TLR sont capables de modifier la biosynthèse des lipides et de modifier les lipides présentés par CD1d, ce qui en retour peut activer les cellules iNKT<sup>140</sup>. Enfin, le virus de l'hépatite B est capable d'induire la production de phospholipases. Ces enzymes vont alors produire des phospholipides qui sont présentés par CD1d<sup>141</sup>.

### **c) Activation indirecte des cellules iNKT par des cytokines :**

Dans le cas du LPS d'*Escherichia coli*, les cytokines IL-12 et IL-18 sont nécessaires à l'activation des cellules iNKT et l'expression de CD1d n'est dans ce cas pas requise sur les cellules dendritiques<sup>142</sup>. Ce mécanisme de reconnaissance TCR-indépendant est également important dans l'immunité anti-cytomégalovirus (CMV)<sup>143</sup>. Il existe donc un mode d'activation des cellules iNKT dépendant principalement de cytokines. Plusieurs études ont ainsi montré que les iNKT relarguent de l'IFN- $\gamma$  après une stimulation par de l'IL-12 et de l'IL-18<sup>144-146</sup>.

Les cellules iNKT utilisent donc plusieurs méthodes de détection de microbes : reconnaissance directe de glycolipides exogènes présentés par CD1d, détection de la présence de microbes par un complexe CD1d/lipide endogène, ou de manière TCR indépendante en présence de cytokines inflammatoires (figure 7).



**Figure 7 : Différents modes d'activation des cellules iNKT.** Les cellules iNKT peuvent être activées de manière directe en reconnaissant un antigène microbien présenté par une CPA (panel de gauche). Elles peuvent aussi être activées en reconnaissant un antigène endogène en présence de cytokines (panel du milieu). Enfin, les cellules iNKT peuvent être activées de manière TCR-indépendante en présence de cytokines comme l'IL-12 et l'IL-18 (panel de droite). Figure réalisée d'après <sup>147</sup>.

Par ailleurs, les voies directes et indirectes d'activation peuvent être utilisées pour un même pathogène. Ainsi, des bactéries comme *Sphingomonas yanoikuyae* ou *Streptococcus pneumoniae* expriment des antigènes reconnus par les cellules iNKT. Cependant, la réponse des cellules iNKT dépend aussi de la production d'IL-12 par les cellules dendritiques<sup>148</sup>.

#### 14. Fonction des cellules iNKT :

##### a) Activation des cellules iNKT :

L'activation des cellules iNKT conduit à leur prolifération et à la sécrétion de cytokines, qui s'accompagnent d'une diminution de l'expression de surface de leur TCR. Celui-ci est alors internalisé<sup>149</sup>. En plus de l'IL-4 et de l'IFN- $\gamma$ , les cellules iNKT activées peuvent produire de l'IL-2, de l'IL-3, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-9, de l'IL-10, de l'IL-13, de l'IL-17, de l'IL-21, du TNF- $\alpha$ , du TGF- $\beta$ , du GM-CSF, ainsi que plusieurs chemokines<sup>134,135</sup>. Une stimulation répétée des cellules iNKT peut aussi conduire chez la souris à un état d'anergie des cellules iNKT<sup>150</sup>. Les mécanismes conduisant à cette anergie ne sont pas compris. Les cellules iNKT peuvent alors avoir des effets pro- ou anti-inflammatoires selon leur mode d'activation (direct ou indirect), l'environnement cytokinique, la durée et la force de leur activation<sup>151</sup>. De plus, les cellules iNKT de différents organes semblent avoir différentes propriétés effectrices<sup>41</sup>. Le lieu d'activation peut donc aussi jouer sur la contribution des cellules iNKT à une réponse immunitaire.

## **b) Production de cytokines :**

La très grande majorité des études portant sur les fonctions des cellules iNKT utilise l' $\alpha$ GalCer pour activer ces cellules. Ce ligand a la propriété de faire produire par les cellules iNKT des cytokines TH1 (IFN- $\gamma$ ) et des cytokines TH2 (IL-4). De nombreuses études ont alors porté sur l'utilisation d'analogues de l' $\alpha$ GalCer pour essayer de faire basculer les cellules iNKT vers un mode TH1 ou un mode TH2. Les deux ligands prototypiques sont l' $\alpha$ -C-GalCer et l'OCH qui induisent un profil respectivement TH1 et TH2 sans que cette différence ne soit clairement comprise<sup>152</sup>.

## **c) Des cellules iNKT régulatrices FoxP3<sup>+</sup>, les cellules iNKTreg :**

Du fait de leur rapidité de production de cytokines, les cellules iNKT sont considérées comme des cellules immunorégulatrices. L'étude de l'expression de FoxP3 dans les cellules iNKT a montré que chez l'homme comme chez la souris, une population de cellules iNKT exprimant FoxP3 apparaît *in vitro* en présence de TGF- $\beta$ <sup>153</sup>. Cette cytokine est en effet importante pour la transformation de cellules T CD4<sup>+</sup> conventionnelles en cellules Treg exprimant FoxP3<sup>154</sup> et pour le maintien de ces cellules et de leur activité suppressive en périphérie<sup>155</sup>. Ces cellules iNKTreg expriment alors des marqueurs spécifiques des cellules Treg comme CD25, GITR et CTLA-4<sup>153</sup>. L'étude des cellules Treg conventionnelles montre qu'elles exercent leur action suppressive par des mécanismes mettant en contact la cellule régulatrice et sa cible via la molécule de surface GITR<sup>156,157</sup>. De la même manière, les cellules iNKTreg obtenues *in vitro* sont capables d'inhiber la prolifération de cellules T conventionnelles par un mécanisme impliquant un contact cellulaire et dépendant de GITR. Chez l'homme, une équipe a mis en évidence des cellules iNKT exprimant FoxP3 en clonant des cellules iNKT du sang de contrôles<sup>158</sup>. Néanmoins, ces cellules n'ont pas d'action immunosuppressive comme le montre la co-culture de clones iNKTreg avec des cellules cibles. Au contraire, celle-ci entraîne la prolifération des cellules cibles à cause de la production par les cellules iNKTreg d'IL-2. En 2012, il a été montré que des cellules iNKT mises en expansion en présence de TGF- $\beta$  expriment FoxP3, mais comme déjà observé, n'ont pas d'action immunosuppressive. Si pendant la culture on ajoute de la rapamycine qui est un inhibiteur de mTOR et qui potentialise l'action régulatrice des cellules Tregs conventionnelles<sup>159</sup>, les cellules iNKT acquièrent cette fonction suppressive. Cette action ne dépend toutefois pas de contacts cellulaires et serait due à la forte surexpression de CD25 par les cellules iNKTreg en présence de rapamycine, ce qui permettrait aux cellules iNKTreg de

dépriver les cellules cibles en IL-2<sup>160</sup>. Même si *in vivo* ces cellules sont difficiles à mettre en évidence, on peut penser que dans des environnements riches en TGF- $\beta$  comme l'intestin, ces cellules puissent jouer un rôle régulateur.

#### **d) Les cellules iNKT, entre système immunitaire et système nerveux :**

La découverte dans les années 2000 du réflexe inflammatoire a lancé un pont entre système immunitaire et système nerveux : l'intensité de la réponse inflammatoire peut être sous le contrôle de neurotransmetteurs<sup>161</sup>. De nombreux travaux ont ensuite montré l'existence de ce lien<sup>162</sup>. Des études ont montré que les cellules iNKT sont mobilisables par le système nerveux<sup>163</sup>. Dans un modèle murin d'attaque cérébrale, l'équipe de Paule Kubes a étudié les cellules iNKT hépatiques<sup>164</sup>. Suite au déclenchement de l'attaque, les cellules iNKT hépatiques sont activées comme le montre l'augmentation de l'expression du marqueur CD69. Le mode d'activation des cellules iNKT est surprenant. Celui-ci ne dépend en effet pas du TCR des cellules iNKT ni des cytokines comme l'IL-12 ou l'IL-18 qui servent à activer les cellules iNKT de manière TCR-indépendante. En revanche, l'activation des cellules iNKT est inhibée si on utilise un  $\beta$ -bloquant, le propranolol. De même, la destruction chimique des terminaisons de neurones possédant de la noradrénaline dans le foie inhibe l'activation des cellules iNKT. Enfin, l'utilisation de noradrénaline *in vivo* ou *in vitro* montre que les cellules iNKT sont activées par ce neurotransmetteur. Ces études montrent donc que les cellules iNKT sont capables par le biais de neurotransmetteurs de faire la jonction entre système nerveux et système immunitaire.

#### **e) Fonction cytotoxique :**

Les cellules iNKT expriment de la perforine, des granzymes, FasL et TRAIL et il a été montré par plusieurs études que les cellules iNKT sont capables d'utiliser leurs molécules cytotoxiques pour lyser des cellules cibles<sup>35</sup>. Les cellules iNKT sont aussi impliquées dans la contraction de la réponse immunitaire : les cellules iNKT CD4<sup>-</sup> sont ainsi capables de supprimer la prolifération de cellules T activées en tuant par un mécanisme CD1d-dépendant des cellules T et des cellules dendritiques<sup>165</sup>. Cette fonction immunosuppressive pourrait intervenir lors de réponses immunitaires contre des infections, des tumeurs ou dans le cadre d'une réaction auto-immune.

#### **f) Interactions des cellules iNKT avec les autres cellules du système immunitaire :**

Les cellules iNKT activées par de l' $\alpha$ GalCer sont capables d'interagir avec les cellules du système immunitaire inné ou adaptatif par un mécanisme de transactivation qui dépend des cytokines sécrétées par les cellules iNKT. Ces cytokines sont ainsi capables d'activer les cellules NK, les cellules T conventionnelles  $CD4^+$  ou  $CD8^+$ , les macrophages et sont capables de recruter les cellules dendritiques et les neutrophiles<sup>166,167</sup>. Les cellules iNKT interagissent aussi avec les cellules Treg  $CD4^+CD25^+$  et peuvent moduler leur fonction par un mécanisme IL-2 dépendant. En retour, les cellules Treg inhibent l'activité des cellules iNKT<sup>168</sup>. Les cellules iNKT sont aussi capables d'interagir avec les cellules T  $\gamma\delta$ <sup>169</sup>.

Par ailleurs, les cellules iNKT peuvent jouer un rôle important dans la réponse humorale. En 2003, une étude a mis en évidence que les cellules iNKT peuvent induire la prolifération et la sécrétion d'anticorps par les cellules B. Cette action est CD1d dépendante<sup>170</sup>. Les cellules iNKT jouent également un rôle dans l'établissement d'une mémoire humorale<sup>171</sup>. En outre, il est connu que les cellules iNKT favorisent la réponse B en réponse aux d'antigènes lipidiques<sup>172,173</sup>. En 2011, deux équipes ont identifié une sous population responsable de cette action sur les cellules B qui dépend de l'IL-21 et du facteur de transcription Bcl-6<sup>174,175</sup>. Cette population appelée iNKT *follicular helper* (iNKT FH) a donc une fonction similaire à celles des cellules T  $CD4^+$  FH. Néanmoins, l'aide apportée par les cellules iNKT aux cellules B est de plus courte durée que celle apportée par les cellules T conventionnelles  $CD4^+$  FH<sup>176</sup>.

Fortes de leur mode d'activation, de leur capacité de production de cytokines et de leurs interactions avec les autres acteurs du système immunitaire, les cellules iNKT sont impliquées dans toute une gamme de réponses immunitaires.

#### **g) Les cellules iNKT et la surveillance tumorale :**

C'est dans un crible à la recherche de composés anti-tumoraux que l' $\alpha$ GalCer a été identifié<sup>12</sup>. Néanmoins, l'effet anti-tumoral observé est plus le fait des cellules NK qui sont activées par la production d'IFN- $\gamma$  des cellules iNKT que d'un rôle direct des cellules iNKT dans la lyse des cellules tumorales. Cependant, une étude de Bellone et al. a montré que les cellules iNKT sont capables d'avoir une action antitumorale directe dans un modèle murin spontané de carcinome<sup>177</sup>. Il a également été mis en évidence que les cellules iNKT sont

capables de reconnaître *in vitro* des cellules tumorales de patients atteints de leucémie myélomonocytaire. Ces cellules expriment en effet CD1d et sont sensibles à la lyse par les cellules iNKT<sup>178</sup>. Cependant, la différence de reconnaissance de CD1d exprimé par des cellules malignes ou par des cellules normales n'est pas clairement comprise. Il est raisonnable de penser que des cellules malignes présentent via CD1d un panel de ligands différents des cellules normales. Néanmoins, si l'expression de CD1d a été montrée sur des cellules hématopoïétiques malignes, la molécule CD1d n'est que faiblement exprimée voire pas du tout par la plupart des tumeurs solides. Dans une étude de Crowe et al., des souris sauvages sont pourtant capables au contraire des souris déficientes en cellules iNKT d'éliminer une tumeur alors que celle-ci n'exprime pas CD1d<sup>179</sup>. Les cellules iNKT sont donc capables d'induire le rejet de tumeurs de manière indirecte. Ces observations suggèrent l'existence d'un mécanisme de reconnaissance indirecte ou un mécanisme de présentation croisée aux cellules iNKT<sup>180</sup>. Une étude de Shimizu et al. a mis en évidence cette présentation croisée. En chargeant des cellules tumorales avec de l' $\alpha$ GalCer, les chercheurs ont protégé les souris par une activation des cellules iNKT qui est dépendante de la présence de cellules dendritiques<sup>181</sup>.

Récemment, les cellules iNKT ont été montrées capables de contrebalancer l'effet immunosuppresseur des « *myeloid-derived suppressor cells* » (MDSC)<sup>182</sup>. Cet effet peut aussi participer à l'immunosurveillance des tumeurs. En effet, chez des souris déficientes en cellules iNKT et porteuses de tumeurs, on retrouve plus de MDSC dans la rate ou le liquide péritonéal que chez des souris sauvages porteuses de tumeurs<sup>183</sup>. Une étude de 2009 a montré que les cellules iNKT humaines peuvent avoir un effet anti-tumoral contre des neuroblastomes n'exprimant pas CD1d. Dans ce cas-là, l'action des cellules iNKT est due à l'action sur les *Tumor Associated Macrophages* qui expriment CD1d et qui sont connus comme participant à la progression tumorale<sup>184</sup>. De la même manière, les cellules iNKT régulent l'activité immunosuppressive des neutrophiles ayant été en contact avec du *Serum Amyloid A* (SAA) et qui sont retrouvés chez des patients étant atteints de mélanomes<sup>185</sup>. Il a été également montré que l'IFN- $\gamma$  produit par les cellules iNKT permet de réduire l'angiogénèse<sup>186</sup> ce qui offre un mécanisme supplémentaire de lutte contre les tumeurs.

De plus, plusieurs groupes ont observé une réduction des cellules iNKT dans le sang de patients souffrant de syndromes myélodysplasiques<sup>187,188</sup>. Par ailleurs, une étude prospective chez des enfants allogreffés suite à une leucémie ou une myélodysplasie a été effectuée par de Lalla et al.<sup>189</sup>. Cette dernière montre une forte corrélation entre l'absence de

rechute et la reconstitution du pool de cellules iNKT du donneur chez l'hôte. Cette étude confère ainsi un rôle aux cellules iNKT dans la surveillance anti-tumorale.

Les cellules iNKT participent donc à la surveillance anti-tumorale soit en reconnaissant directement les cellules malignes, soit en agissant indirectement par la modulation des cellules immuno-suppressives ou par l'activation des autres cellules du système immunitaire, notamment les cellules NK.

#### **h) Les cellules iNKT dans les infections bactériennes :**

De nombreux mécanismes activant les cellules iNKT durant des infections bactériennes ont été identifiés. Des glycosphingolipides présents dans les parois de bactéries comme *Sphingomonas sp.* et *Ehrlichia sp.* activent directement les cellules iNKT quand ils sont présentés par des cellules dendritiques. Dans le cas de bactéries comme *Salmonella sp.*, la réponse des cellules iNKT est déclenchée par un processus autoréactif qui implique l'intervention d'un glycosphingolipide endogène comme l'iGb3. Cette réponse nécessite aussi une signalisation par un TLR et de l'IL-12<sup>190</sup>. Dans tous ces cas-là, les cellules iNKT ont un rôle protecteur contre l'infection de la souris. Mais les cellules iNKT peuvent aussi avoir un rôle délétère comme lors de l'infection par *Chlamydia muridarum* en induisant une réponse TH2 par une forte production d'IL-4<sup>191</sup>. Les cellules iNKT peuvent aussi participer à des phénomènes de chocs septiques : l'inoculation de fortes doses de *Sphingomonas capsulata* à des souris entraîne un choc septique qui dépend des cellules iNKT<sup>78</sup>. Chez l'homme, les cellules iNKT pourraient également avoir un rôle protecteur vis-à-vis de certaines infections bactériennes. C'est le cas de l'infection par *Brucella suis*. pour laquelle les cellules iNKT reconnaissent et lysent les macrophages infectés par une interaction Fas/FasL<sup>192</sup>. Les cellules iNKT sont donc capables de réagir à des infections bactériennes en reconnaissant directement des motifs bactériens ou en étant activées par d'autres cellules du système immunitaire.

#### **i) Les cellules iNKT dans les infections virales :**

Dans certaines infections virales, les cellules iNKT pourraient jouer un rôle important, notamment vis-à-vis des virus du groupe herpes chez l'homme<sup>193-195</sup>. Il n'a pas encore été découvert de ligand de CD1d qui soit encodé par des virus. Il est donc vraisemblable que les cellules infectées par un virus activent les cellules iNKT par un mécanisme autoréactif impliquant des glycolipides endogènes. Pour plusieurs virus, des études montrent un rôle protecteur des cellules iNKT :



## **HIV :**

Le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) infecte les cellules iNKT qui finissent par disparaître de l'hôte<sup>196,197</sup>. La souche HIV-1 se multiplie d'ailleurs plus rapidement dans des cellules iNKT que dans des cellules T conventionnelles et il existe une corrélation entre un haut titre viral et un nombre de cellules iNKT circulantes réduit. Cette réduction des cellules iNKT en périphérie a aussi été liée à une augmentation de l'incidence des tumeurs retrouvées chez des patients HIV<sup>196</sup>.

## **Hépatite B (HBV):**

Plusieurs études ont suggéré un rôle des cellules iNKT au cours de l'infection par l'HBV. Une étude de 2011 a montré qu'une épidémie d'HBV associée à une haute mortalité en Inde était accompagnée chez les malades d'une forte réduction des cellules NKT dans le sang des patients<sup>198</sup>. De plus, des cellules iNKT activées sont capables *in vivo* chez la souris transgéniques pour l'HBV d'empêcher la réplication du virus<sup>199</sup>. En 2012, une équipe a montré, dans des hépatocytes humains ou murins, que l'HBV est capable d'induire la production de phospholipases qui synthétisent des phospholipides présentés par CD1d à la surface des hépatocytes. Cette présentation est capable d'activer les cellules iNKT. Cette activation des cellules iNKT nécessite la présence d'IL-12 *in vivo*. Par ailleurs, l'absence des cellules iNKT ou de l'expression de CD1d conduit dans des modèles animaux à une mauvaise réponse T et B. Les cellules iNKT participent donc au contrôle de l'infection par l'HBV grâce une présentation altérée de lipides endogènes<sup>141</sup>.

## **Hépatite C :**

Dans le cas de l'hépatite C, des études chez l'homme ont montré que les cellules iNKT ont un rôle protecteur dans le cas d'une infection aiguë. En revanche, ces cellules deviennent délétères lors de l'établissement d'une infection chronique en participant, par leur production de cytokines, à la fibrose hépatique<sup>200,201</sup>.

## **Grippe :**

Dans le cas du virus de la grippe, il a été montré que la co-administration d' $\alpha$ GalCer avec le vaccin nasal contre la grippe augmente la protection contre différentes souches virales. Cette protection supplémentaire est due à un afflux et une activation des cellules iNKT par des cellules dendritiques dans les muqueuses nasales<sup>202</sup>. Enfin, il a été montré que chez la souris comme chez l'homme, les cellules iNKT ont la capacité de réduire l'activité



immunosuppressive des MDSC permettant ainsi une meilleure réponse immunitaire contre le virus de la grippe<sup>182</sup>.

### **HSV-1 :**

Une étude avec la souche virulente C16 d'HSV-1 a montré que des souris CD1d KO et J $\alpha$ 18 KO ont une clairance réduite de l'infection, des lésions cutanées plus importantes et une plus grande dissémination du virus dans le système nerveux<sup>203</sup>.

### **Virus de la varicelle et du zona (VZV) :**

Une preuve indirecte de l'action des cellules iNKT dans le contrôle de l'infection par le virus de la varicelle est la description de deux patients ayant développé une varicelle sévère suite à une vaccination par un vaccin vivant et n'ayant pas d'autre déficit immunitaire connu qu'un déficit en cellules iNKT<sup>204,205</sup>. Néanmoins, il est impossible de savoir si le défaut en cellules iNKT est une conséquence de l'infection ou bien s'il la précède.

### **Virus d'Epstein-Barr (EBV) :**

Les cellules iNKT pourraient avoir un rôle dans la contraction de la réponse anti-EBV comme le suggère une étude de Ho et al.<sup>165</sup>. Une étude a aussi montré que des cellules iNKT CD8<sup>+</sup> sont capables de tuer des cellules infectées par l'EBV et des cellules dendritiques par un mécanisme CD1d-dépendant<sup>206</sup>. Dans plusieurs études, la population de cellules iNKT CD8<sup>+</sup> est effectivement induite par l'infection par l'EBV<sup>207</sup>.

### **Des mécanismes d'échappement :**

Un argument supplémentaire en faveur d'un rôle des cellules iNKT dans le contrôle des infections virales est l'existence de mécanismes d'échappement développés par les virus. Les protéines B1R et H5R du virus de la vaccine ont été montrées comme inhibant la présentation antigénique par CD1d<sup>208</sup>. Chez l'homme, les protéines gp120, Vpu et Nef du virus HIV inhibent l'expression de CD1d à la surface cellulaire<sup>209-211</sup>. Il a ainsi été montré une réduction de l'expression de CD1d sur les monocytes CD14<sup>+</sup> de patients HIV en comparaison avec des sujets sains ou des sujets HIV placés sous trithérapie. L'expression de CD1d est d'ailleurs inversement proportionnelle à la charge virale<sup>212</sup>. Le papilloma virus humain via sa protéine E5 empêche le trafic correct de CD1d à la surface des cellules infectées<sup>213</sup>. HHV-8 utilise lui les protéines MIR1 et MIR2 pour inhiber l'expression à la surface de CD1d<sup>214</sup>. Enfin, Yuan et al. ont montré qu'HSV-1 réduit l'expression de CD1d à la surface des cellules dendritiques en interférant avec le recyclage de la molécule CD1d<sup>215</sup>.

Il existe donc plusieurs stratégies mises en place par les virus pour se soustraire à une reconnaissance des cellules infectées par les cellules iNKT. Ces stratégies semblent indiquer que les cellules iNKT sont importantes pour le contrôle des infections par ces virus.

#### **j) Régulation de l'auto-immunité par les cellules iNKT :**

L'hypothèse d'un rôle des cellules iNKT dans l'auto-immunité est apparue lorsqu'il a été observé une diminution du nombre de ces cellules au cours de plusieurs maladies auto-immunes chez l'homme, ainsi que dans certains modèles animaux<sup>216</sup>.

Chez les patients en poussée de sclérose en plaque (SEP) il a été mis en évidence une diminution du nombre de cellules iNKT, avec une normalisation de ces chiffres chez les patients en rémission<sup>217</sup>. La souche de souris SJL/J, particulièrement sensible à l'induction d'Encéphalite Expérimentale Auto-Immune (EAE), n'exprime pas la chaîne V $\beta$ 8. Ces souris ont donc un nombre diminué de cellules iNKT<sup>218</sup>. De plus, la surexpression du TCR V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 chez la souris NOD diminue la susceptibilité à l'EAE<sup>219</sup>. Dans différents modèles, l'injection d' $\alpha$ GalCer est capable d'induire une protection vis à vis de l'induction d'EAE, mais cet effet est variable en fonction du moment et de la voie d'administration, de la dose injectée et du type de souris.

Plusieurs études ont aussi montré une diminution du nombre de cellules iNKT circulantes, et une altération de leurs sécrétions cytokiniques chez des patients atteints de lupus érythémateux systémique (LES), avec un retour à la normale après traitement par corticoïdes<sup>220</sup>. Il existe plusieurs modèles murins utilisés pour étudier le lupus, dont le plus connu est celui de la souris *lpr*, qui est déficiente en Fas. Ces souris ont, de façon préexistante à la survenue des lésions, une diminution du nombre de cellules iNKT, qui ont une sécrétion cytokinique altérée<sup>221</sup>. Le transfert adoptif de cellules NK1.1<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> provoque une diminution de la production d'auto-anticorps<sup>222</sup>. Enfin, le traitement par l' $\alpha$ GalCer augmente le nombre de cellules iNKT et améliore les lésions inflammatoires cutanées. Cependant, ce rôle protecteur des cellules iNKT n'est pas retrouvé dans un autre modèle murin de lupus, les souris (NZBxNZW) F1. Le traitement par anticorps anti-CD1d améliore la maladie, suggérant un rôle plutôt néfaste des cellules iNKT dans ce modèle<sup>223</sup>.

Au cours de la polyarthrite rhumatoïde, le nombre des cellules iNKT a également été rapporté comme diminué dans le sang des patients, et parfois dans la synoviale<sup>224</sup>. Dans le modèle expérimental le plus utilisé, qui consiste à injecter aux souris du collagène

hétérologue, il a été rapporté une réduction de sévérité de l'arthrite après traitement par anti-CD1d, suggérant un rôle délétère des cellules iNKT dans cette pathologie. De plus, les souris J $\alpha$ 18 KO ont des arthrites induites moins sévères. Néanmoins, les traitements par l' $\alpha$ GalCer ou l'OCH semblent protéger les souris C57BL/6 de l'arthrite induite expérimentalement<sup>225</sup>.

Dans le diabète de type 1, le rôle des cellules iNKT est controversé. Chez des patients, le nombre de cellules iNKT circulantes a été décrit comme diminué, normal ou augmenté<sup>226</sup>. Le rôle des cellules iNKT a été étudié dans le modèle murin de diabète spontané, la souris *Non Obese Diabetic* (NOD). Ces souris ont un nombre diminué de cellules iNKT dans le thymus et la rate, et le transfert adoptif de cellules iNKT les protège de la survenue du diabète<sup>227,228</sup>. Par ailleurs, plusieurs études rapportent que des injections répétées d' $\alpha$ GalCer empêchent la survenue de diabète<sup>229-231</sup>.

Enfin, des variations du nombre de cellules iNKT ont été notées chez des patients atteints d'autres pathologies auto-immunes : augmentation dans la myasthénie, réduction dans la sclérodermie, le syndrome de Sjogren ou encore la maladie de Basedow<sup>226</sup>.

## **15. Thérapie à base de cellules iNKT :**

Contrairement aux maladies auto-immunes où leur rôle est complexe et divers, les cellules iNKT ont un rôle plus clair dans les pathologies tumorales et infectieuses. De nombreuses études ont alors visé à utiliser l' $\alpha$ GalCer ou ses dérivés pour tenter de moduler la réponse immunitaire en activant les cellules iNKT. Des essais cliniques de phase I ont montré l'inocuité de l' $\alpha$ GalCer chez l'homme<sup>232</sup>. L'administration d' $\alpha$ GalCer résulte en une expansion des cellules iNKT du patient et une augmentation du niveau de cytokines dans le sang<sup>233</sup>. Plusieurs essais cliniques ont alors été effectués dans des cas d'infections virales ou de cancers<sup>234,235</sup>. Même si les premiers essais semblent prometteurs, les traitements ne sont pas encore au point. Les recherches se concentrent aujourd'hui sur l'utilisation d'analogues de l' $\alpha$ GalCer et de molécules co-stimulatrices afin d'augmenter l'efficacité du traitement<sup>236</sup>.

## **16. Conclusions :**

Même si elles sont issues du même précurseur que les cellules T  $\alpha\beta$  conventionnelles, les cellules iNKT représentent une sous-population bien particulière de cellules immunitaires capables d'avoir des effets d'immuno-régulation et d'inflammation. Les cellules iNKT ne sont pas sélectionnées sur des cellules épithéliales grâce à des molécules du CMH de classe I ou II, mais sur des cellules DP à l'aide de la molécule CD1d et d'un lipide endogène. Cette

sélection particulière nécessite des signaux supplémentaires qui sont fournis par la voie des SLAM-R. Elles dépendent aussi fortement de l'IL-15 et du facteur de transcription PLZF. Par ailleurs, du fait de leur reconnaissance de lipides endogènes et exogènes, de leurs fonction diverses, de la rapidité avec laquelle elles répondent à une stimulation et de leurs différents modes d'activation, les cellules iNKT se rapprochent des cellules innées. Elles ont aussi la capacité d'interagir avec de nombreux types cellulaires du système immunitaire et de favoriser une réponse adaptative. Il a été proposé que les cellules iNKT fassent le lien entre immunité innée et immunité adaptative. Le tableau ci-dessous résume les principales différences entre cellules iNKT et cellules T  $\alpha\beta$  conventionnelles.

	Cellules T conventionnelles	Cellules iNKT
Sélection thymique des cellules DP	Sur des cellules épithéliales	Sur des cellules DP
Survie des cellules DP	Pas toujours nécessaire	Requise
Nature de l'antigène	Peptidique	Lipidique
Proportion	Variable	Faible
Diversité du répertoire	Grande	Très faible
CD4/CD8	CD4 <sup>+</sup> ou CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> ou DN ou CD8 <sup>+</sup>
Expression de récepteurs NK	Possible	Oui
CD161 <sup>+</sup> PLZF <sup>+</sup>	Certaines	Majoritairement
Production de cytokines	Lente	Rapide
Auto-réactivité	Rares	Oui
Phénotype mémoire	Certaines	Toutes
Développement dépendant des SLAM-R/SAP/Fyn	Non	Oui

**Tableau 3: Comparaison des propriétés des cellules iNKT et des cellules T conventionnelles.**

#### **D. LES CELLULES MAIT :**

##### **1. Historique et définition :**

Les cellules MAIT représentent la deuxième population de cellules T invariantes identifiée chez l'homme après les cellules iNKT. Porcelli et al. furent les premiers à identifier dans des cellules DN humaines un autre réarrangement invariant : le réarrangement V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33<sup>7</sup>. Ce réarrangement particulier présente un CDR3 de longueur constante. La chaîne  $\beta$

associée utilise préférentiellement les segments V $\beta$ 13.1, V $\beta$ 13.3 et V $\beta$ 2. Ces cellules sont restreintes par MR1 (*Major histocompatibility complex class I-related gene protein*). Les cellules MAIT murines correspondantes utilisent le réarrangement V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 en association avec les chaînes V $\beta$ 6 et V $\beta$ 8.

## **2. MR1 et les ligands des cellules MAIT :**

MR1 a initialement été cloné chez l'homme<sup>237</sup>. MR1 est la molécule du CMH la plus conservée, présentant plus de 90% d'homologie entre l'homme et la souris. Contrairement aux molécules du CMH de classe I classiques, l'expression de MR1 est indépendante de la protéine TAP. On peut détecter l'ARNm de MR1 de manière ubiquitaire chez l'homme et la souris et MR1 est très faiblement exprimée en surface, alors que l'expression intracellulaire est élevée dans le réticulum endoplasmique<sup>238</sup>. Une faible quantité du complexe MR1-ligand pourrait donc suffire à déclencher une réponse des cellules MAIT.

## **3. Phénotype et localisation :**

Les cellules MAIT sont très présentes dans le sang où elles peuvent représenter jusqu'à 15% des cellules T DN. Elles sont aussi retrouvées en grande quantité dans l'intestin et le foie où elles peuvent représenter jusqu'à 45 % des lymphocytes hépatiques. Dans le sang d'adultes sains, elles ont un phénotype effecteur (CD95<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) mémoire (CD27<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD122<sup>+</sup>)<sup>239</sup>. Chez l'homme, les cellules MAIT sont principalement DN, CD8 $\alpha\alpha$  et CD8 $\alpha\beta$ . Enfin, les cellules MAIT expriment fortement le marqueur CD161 de la famille NK et l'IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup>. Par PCR quantitative et séquençage, il a été établi que les cellules MAIT, définies comme V $\alpha$ 7.2<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>, forment une population oligoclonale. Pourtant, les cellules MAIT ne sont pas en cycle en périphérie (Ki-67<sup>-</sup>) et prolifèrent peu lorsqu'on les stimule avec un anti-TCR ou avec des CPA infectées par des bactéries<sup>239,240</sup>. Il faut préciser que ces expérimentations ont été réalisées *in vitro* et qu'il manque peut être un facteur nécessaire à la survie ou à la prolifération des cellules MAIT. La stimulation de cellules MAIT triées à partir de sang périphérique par un anti-CD3 et un anti-CD28 ou par des cellules infectées par des bactéries conduit à la production d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et de Granzyme A et B. Par ailleurs, des cellules MAIT stimulées par de la PMA/Ionomycine produisent de l'IL-17 mais cette production dans des conditions physiologiques reste à démontrer<sup>239</sup>. Dans ces conditions de stimulation, il n'a pas été trouvé de production d'IL-4. L'ensemble de ces données chez l'homme montre que les cellules

MAIT ont un profil cytokinique pro-inflammatoire. L'étude des cellules MAIT chez la souris est rendue difficile par leur faible nombre et l'absence d'anticorps spécifique de ces cellules. Néanmoins, chez la souris sauvage, les cellules MAIT sont CD44<sup>+</sup> et ne sont pas détectées dans le thymus, le foie, ou la moelle osseuse.

#### **4. Développement des cellules MAIT :**

L'utilisation de modèles de souris transgéniques pour le réarrangement canonique V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 spécifique des cellules MAIT, et visant à forcer leur développement, a permis de mieux comprendre le développement de ces cellules. Ainsi dans un modèle de FTOC de ces souris transgéniques avec des thymus exprimant MR1, on trouve une augmentation des cellules T utilisant les réarrangements V $\beta$ 6 et V $\beta$ 8 (utilisés majoritairement par les cellules MAIT) en comparaison avec des cellules T obtenues avec des thymus MR1-déficients<sup>241</sup>. Contrairement aux cellules T conventionnelles, l'expression de MR1 n'est pas requise sur les cellules épithéliales du thymus. Le développement des cellules MAIT n'est cependant pas similaire à celui des cellules iNKT car il ne requiert pas l'expression de MR1 sur les cellules T ou B dans le thymus<sup>242</sup>. La cellule hématopoïétique exprimant MR1 à l'origine de la sélection des MAIT dans le thymus n'a pas encore été identifiée. Par ailleurs, le ligand endogène permettant la sélection des cellules MAIT via MR1 est lui aussi encore inconnu. Contrairement aux cellules iNKT, la voie de signalisation SLAM n'est pas requise pour le développement des cellules MAIT. Les patients mutés dans *SH2D1A* ont en effet un nombre légèrement diminué voire normal de cellules MAIT en périphérie<sup>241</sup>.

Les cellules MAIT se développent dans le thymus et en sortent naïves, contrairement aux cellules iNKT. Pour s'accumuler en périphérie, elles ont besoin de la présence de cellules B et d'une flore commensale<sup>241,242</sup>. Chez l'homme, elles acquièrent rapidement après la naissance un phénotype mémoire lié à l'établissement de la flore commensale de l'enfant<sup>239</sup>. Les MAIT sont déjà CD161<sup>+</sup> et IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup> dans le sang de cordon et acquièrent petit à petit leur phénotype mémoire<sup>241,243</sup>. En effet, chez un enfant de deux jours, 50% des cellules MAIT sont CD45RO<sup>-</sup>. Chez le même enfant, à partir de 3 mois, les cellules sont devenues majoritairement CD45RO<sup>+</sup>. Contrairement à l'homme, les cellules MAIT chez la souris de laboratoire restent peu nombreuses et naïves dans le sang (ce qui peut soit refléter le statut bactériologique des souris en animalerie, soit refléter la perte d'un gène nécessaire à la survie de ces cellules lors de la sélection des souris de laboratoire). Ce lien avec la flore a néanmoins été vérifié chez la souris : même si les cellules MAIT sont peu présentes chez la souris, des

souris élevées dans des conditions stériles ne présentent aucune cellule MAIT. De plus, la reconstitution de ces souris axéniques avec une flore bactérienne ramène le nombre de cellules MAIT à celui observé chez des souris élevées dans des conditions normales d'animalerie<sup>240</sup>. L'expression de CD161 et de l'IL-18R $\alpha$  par les cellules MAIT dans le thymus, contrairement aux cellules T conventionnelles, indique que la reconnaissance par le TCR des MAIT de MR1 et d'un ligand endogène déclenche un programme transcriptionnel spécifique. Les cellules MAIT en périphérie, comme les cellules iNKT, expriment le facteur de transcription PLZF<sup>106</sup>. Comme les cellules MAIT quittent le thymus avec un phénotype naïf, on peut penser que PLZF n'intervient pas dans les premiers stades de différenciation des cellules MAIT, mais qu'il est exprimé en périphérie pour l'acquisition du phénotype mémoire/effecteur. De manière concordante, les cellules MAIT murines qui restent naïves n'expriment pas PLZF<sup>241</sup>.

Ainsi, contrairement aux cellules iNKT qui se développent et acquièrent leur caractère effecteur/mémoire dans le thymus, les cellules MAIT se développent dans un premier temps dans le thymus avant d'acquérir leur phénotype effecteur/mémoire en périphérie, ce qui nécessite certainement différents facteurs intervenant à différents temps.

## **5. Facteurs importants pour le développement et l'homéostasie des cellules MAIT :**

Il existe peu de littérature à ce sujet. L'expression de la molécule MR1 est évidemment requise pour la sélection des cellules MAIT dans le thymus. Comme décrit précédemment, les cellules B sont nécessaires en périphérie pour l'établissement des cellules MAIT. Ainsi, tout facteur influant le développement des cellules B pourrait également jouer un rôle sur l'homéostasie périphérique des cellules MAIT. C'est le cas par exemple de Btk (*Bruton tyrosine kinase*)<sup>242</sup>: les patients ayant une mutation dans le gène codant pour cette protéine ont une alymphocytose B, et une diminution très importante du nombre de leurs cellules MAIT. Enfin, le réarrangement V $\alpha$ 7.2/V $\alpha$ 19-J $\alpha$ 33 des cellules MAIT est le plus distal et n'intervient donc qu'en fin de vie des cellules DP n'ayant pas eu de réarrangements fonctionnels. De la même manière que pour les cellules iNKT, les facteurs jouant sur la survie des cellules DP auront un rôle dans le développement des cellules MAIT. Par exemple, des souris déficientes en c-Myc n'ont quasiment pas de réarrangement V $\alpha$ 19. En revanche, ces mêmes souris surexprimant un facteur antiapoptotique comme Bcl-x<sub>L</sub> permettent le réarrangement V $\alpha$ 19<sup>87</sup>. Des études similaires sur la souris ROR $\gamma$ t KO ont montré le même



type de résultats<sup>244</sup>. Néanmoins, contrairement aux cellules iNKT, le développement des cellules MAIT n'a pas été étudié dans les souris déficientes en c-Myc et ROR $\gamma$ t en présence de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-x<sub>L</sub>. On ne peut donc exclure un rôle direct de c-Myc et ROR $\gamma$  t dans le développement et/ou l'homéostasie des cellules MAIT.

## 6. Rôle des cellules MAIT :

Il n'y a que très peu de données sur le rôle des cellules MAIT *in vivo*. Une étude a toutefois impliqué les cellules MAIT dans la régulation d'un modèle de sclérose en plaques. Des souris exprimant le transgène V $\alpha$ 19 sont protégées d'une induction d'encéphalite. De manière opposée, des souris déficientes pour MR1 sont plus sensibles à cette induction. La protection conférée par les cellules MAIT passe par une diminution de la sécrétion de cytokines TH1 et par une production augmentée d'IL-10 par les cellules B<sup>245</sup>. Néanmoins, l'interprétation de ces données pose problème puisque dans cette étude, il n'y a pas de contrôle avec des souris MR1 KO exprimant le transgène V $\alpha$ 19. On retrouve cependant une accumulation des cellules MAIT dans les lésions de patients souffrant de sclérose en plaques<sup>246</sup>. Enfin, une étude de 2012 a mis en cause les cellules MAIT dans l'aggravation d'un modèle murin d'arthrite induite<sup>247</sup>.

Finalement, le rôle le mieux connu et le mieux étudié des cellules MAIT est un rôle anti-infectieux. Les cellules MAIT sont localisées majoritairement dans l'intestin et dans les organes drainants comme le foie. Cette localisation suggère une relation entre les cellules MAIT et la population microbienne. Par exemple, l'acquisition des marqueurs mémoires par les cellules MAIT juste après la naissance est clairement liée à l'apparition de la flore commensale. Récemment, les cellules MAIT ont été montrées comme réagissant contre des cellules exprimant MR1 et infectées ou cultivées en présence de différents micro-organismes<sup>240,248</sup>. Les cellules MAIT réagissent contre des CPA en présence d'une grande variété de bactéries Gram positives ou Gram négatives (comme des *Bacillus sp.* et *Escherichia coli*), ou des mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis*). Elles réagissent aussi contre des cellules phagocytaires en présence de levures comme *Candida* ou *Saccharomyces*. Cependant, certaines souches bactériennes comme *Streptococcus faecalis*, certains champignons ou l'ensemble des virus testés par les auteurs ne sont pas capables de stimuler les cellules MAIT, ce qui suggère que ces micro-organismes ne possèdent pas le ligand présenté par MR1 ou que les cibles cellulaires utilisées ne sont pas les bonnes. Enfin, des cellules fixées surexprimant MR1 et mises en présence d'*Escherichia Coli* peuvent stimuler



les cellules MAIT. Cela semble indiquer que ces bactéries expriment un ligand ne demandant pas de traitement et capable de se fixer directement sur MR1. L'ensemble de ces résultats penche en faveur de l'existence d'un ligand exogène plutôt que d'un ligand endogène comme pour les cellules iNKT.

La capacité des cellules MAIT à reconnaître une cellule infectée leur confère une activité antibactérienne *in vivo*. Ainsi les cellules MAIT jouent un rôle dans la protection des souris lors d'une infection intra-péritonéale par *E. Coli* ou *Klebsiella pneumoniae*, car les souris déficientes en MR1 présentent une charge bactérienne plus importante que les souris sauvages<sup>240</sup>. De manière concordante, les cellules MAIT chez des patients atteints de tuberculose sont en plus faible proportion dans le sang périphérique et semblent se concentrer aux sites d'infection comme les poumons<sup>248</sup>. Par ailleurs, les cellules MAIT ne peuvent être activées de manière TCR-indépendante de façon aussi diverse que les cellules iNKT. Elles ne sont ainsi pas activées par des CPA qui sont stimulées par leur TLR ou leur NLR. De même, les infections virales n'activent pas les cellules MAIT. Cependant, Chiba et al. ont récemment mis en évidence une activation des cellules MAIT par l'IL-23 de manière TCR-indépendante<sup>247</sup>.

Bien que la molécule présentée par MR1 et reconnue par les cellules MAIT ne soit toujours pas connue, des expériences de traitement d'extrait bactérien par des protéases semblent montrer qu'elle est d'origine peptidique. Ceci est conforme avec le caractère hydrophile de la poche de MR1 qui est incompatible avec l'hypothèse d'un lipide comme dans le cas des cellules iNKT<sup>248</sup>.

L'utilisation de modèles murins transgéniques pour déterminer la fonction des cellules MAIT est un outil utile mais pouvant conduire à des biais d'interprétation. En effet, le faible nombre de cellules MAIT chez la souris de laboratoire incite à utiliser des modèles transgéniques, en induisant par exemple la surexpression de la chaîne V $\alpha$ 19. Les cellules T issues de cette souris ont la capacité de produire de grandes quantités de cytokines qui peuvent être indépendantes de la présence de MR1 et sont liées au développement forcé de ces cellules par l'utilisation du transgène. Ainsi, il est nécessaire de prendre des précautions quant à l'interprétation des résultats de certaines publications ne comparant pas l'effet du transgène en présence ou non de la molécule MR1<sup>245,249,250</sup>.

Les cellules MAIT constituent donc une population de cellules T invariantes qui présentent de nombreux points communs avec les cellules iNKT. Pour le moment, la biologie de ces cellules est moins bien connue que celle des cellules iNKT.

## **E. LES CELLULES T $\gamma\delta$ :**

### **1. Généralités :**

Les cellules T  $\gamma\delta$  sont présentes chez la plupart des vertébrés et, bien qu'elles partagent les mêmes protéines de surface et les mêmes capacités que les cellules T  $\alpha\beta$  (production de cytokines, cytotoxicité), elles ont des propriétés biologiques bien particulières. Elles représentent de 1 à 10% des cellules T circulantes et sont fortement représentées dans certains tissus et organes comme la peau, le système reproducteur ou l'intestin<sup>251</sup>. Chez l'homme, la majorité des cellules T  $\gamma\delta$  sont CD161<sup>+</sup>. Elles expriment aussi chez l'homme ou la souris des marqueurs NK comme CD94, NKG2A, NKG2C et NKG2D<sup>252-254</sup>.

Comme les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , les chaînes  $\gamma$  et  $\delta$  sont codées par des gènes qui sont réarrangés pendant la maturation intrathymique à partir d'un pool de régions codantes. Cependant, la diversité possible est bien plus restreinte que pour les chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  puisqu'il n'y a chez l'homme que 6 gènes codant pour les régions V $\gamma$  et 10 pour les régions V $\delta$ <sup>251</sup> alors que l'on retrouve 54 gènes codant pour les régions V $\alpha$ <sup>255</sup>. Néanmoins, la diversité des récepteurs  $\gamma\delta$  est du même ordre que la diversité des récepteurs  $\alpha\beta$ . Cette diversité est due à des mécanismes non génétiques comme l'insertion aléatoire de nucléotides ou la jonction non fidèle qui ont lieu lors des processus de réarrangements.

### **2. Localisation des cellules T $\gamma\delta$ :**

La distribution des cellules  $\gamma\delta$  est différente selon les tissus. Ainsi, dans le sang périphérique chez l'homme, les cellules V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 peuvent représenter de 50 à 90 % des cellules T  $\gamma\delta$  circulantes<sup>256</sup>. Dans la peau et l'intestin, les cellules T  $\gamma\delta$  sont majoritairement V $\delta$ 1 chez l'homme<sup>257</sup>. Cette répartition des différentes sous-populations de cellules  $\gamma\delta$  se retrouve aussi chez la souris<sup>251</sup>. Cette localisation spécifique des cellules  $\gamma\delta$  selon leur récepteur dépend certainement de chimiokines et de leurs récepteurs<sup>258</sup>. Par exemple, les cellules T  $\alpha\beta$  exprimant le récepteur CCR9 sont attirées dans l'intestin par la chimiokine CCL25 qui y est constitutivement exprimée<sup>259</sup>. CCR9 est aussi exprimé par les cellules T  $\gamma\delta$

intraépithéliales et l'activation des cellules  $\gamma\delta$  par leur TCR conduit à l'augmentation de l'expression de CCR9 de manière préférentielle par les cellules V $\delta$ 1 dans le sang<sup>260</sup>.

### **3. Développement des cellules $\gamma\delta$ :**

Au stade DN3, le pré-TCR  $\alpha\beta$  et le TCR  $\gamma\delta$  sont exprimés à la surface de la cellule. Le consensus actuel est qu'un signal fort transmis par un TCR va diriger la cellule vers la voie  $\gamma\delta$  alors qu'un signal plus faible dirigera la cellule vers la voie  $\alpha\beta$ <sup>261</sup>. La nécessité d'un ligand thymique pour le développement des cellules T  $\gamma\delta$  a été mise en évidence<sup>262</sup>, même si la nature de ce ligand reste mal connue aujourd'hui. Néanmoins, pour les cellules murines T  $\gamma\delta$  portant le réarrangement V $\gamma$ 5V $\delta$ 1 et que l'on retrouve majoritairement dans l'épiderme, skint1, un membre de la superfamille des immunoglobulines, a été montré comme étant impliqué dans leur sélection et leur établissement en périphérie<sup>263</sup>.

### **4. Facteurs importants pour le développement des cellules T $\gamma\delta$ :**

Les mécanismes moléculaires qui régissent le développement des cellules T  $\gamma\delta$  sont mal compris. Néanmoins, certains facteurs importants ont pu être identifiés<sup>264</sup>. Les cellules T  $\gamma\delta$  partagent des facteurs majeurs de développement avec les cellules T  $\alpha\beta$ . Parmi ces facteurs, on retrouve entre autres Rag-1, Rag-2, Ku80, CD3 $\epsilon$ , LAT et l'IL-7. D'autres facteurs jouent uniquement un rôle important pour le développement des cellules T  $\gamma\delta$ , sans affecter le développement des cellules T  $\alpha\beta$ . Parmi ces facteurs, on retrouve les gènes codant pour les locus  $\delta$  et le facteur de transcription PU.1 qui régule négativement le nombre de cellules T  $\gamma\delta$ <sup>265</sup>.

### **5. Modes d'activation :**

Deux caractéristiques différencient fondamentalement les cellules T  $\gamma\delta$  des cellules T  $\alpha\beta$ . Les cellules T  $\gamma\delta$  ne reconnaissent pas forcément des antigènes peptidiques mais des antigènes non conventionnels comme des lipides ou des métabolites microbiens phosphorylés et la reconnaissance de l'antigène ne nécessite pas obligatoirement de présentation par une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou II. Ceci est d'ailleurs cohérent avec l'absence d'expression des marqueurs CD4 ou CD8 par la quasi-totalité des cellules  $\gamma\delta$ <sup>251</sup>. Des études menées pour essayer d'identifier les ligands mis en jeu ont montré leur nature non-protéique et l'importance des résidus phosphatés<sup>266</sup>. Les cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2

reconnaissent des phosphoantigènes comme le (E)-4-hydroxy-3-méthyl-but-2-enyl pyrophosphate (HMB-PP) à des concentrations de l'ordre du picomolaire<sup>267</sup>. HMB-PP est produit par de nombreuses bactéries et le TCR des cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sert donc de senseur de la présence de ces bactéries. Un autre ligand de ces cellules est l'isopentenyl pyrophosphate (IPP) qui est un intermédiaire de la voie de synthèse des isoprénoides dans les cellules eucaryotes. Certaines tumeurs sont ainsi reconnues par les cellules V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 à cause de l'accumulation d'IPP dans les cellules tumorales<sup>268,269</sup>. En plus de ces antigènes non peptidiques, les cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 reconnaissent aussi un complexe ATP-ase mitochondrial/Alipoprotéine A-I que l'on retrouve à la surface de certaines tumeurs<sup>270</sup>. Enfin, les ligands reconnus par le TCR des cellules V $\delta$ 1 peuvent être des lipides présentés par des molécules de la famille CD1<sup>271</sup> et les protéines de stress MICA et MICB<sup>272,273</sup>.

Les cellules T  $\gamma\delta$  expriment aussi des récepteurs de la famille NK comme NKG2D, NKG2A ou NKG2C<sup>254</sup>. Si NKG2D est un récepteur activateur qui reconnaît les protéines de stress comme MICA et MICB, NKG2A et NKG2C sont des récepteurs inhibiteurs qui reconnaissent les molécules de HLA dont l'expression est souvent diminuée lors d'infections virales. Les cellules T  $\gamma\delta$  expriment également des TLR<sup>274</sup> qui leur permettent de servir de senseurs d'agents pathogènes. Les cellules T  $\gamma\delta$  possèdent donc en plus de leur TCR, une panoplie de récepteurs leur permettant de détecter un état de stress de l'hôte.

## 6. Fonctions :

Les fonctions effectrices des cellules T  $\gamma\delta$  sont proches de celles des cellules T  $\alpha\beta$ . Ainsi, les cellules T  $\gamma\delta$  activées utilisent les voies de cytotoxicité médiées par les récepteurs de mort ou par la perforine<sup>275,276</sup>. Les cellules T  $\gamma\delta$  peuvent lyser des macrophages infectés ou des cellules tumorales<sup>277</sup>. Par ailleurs, des cellules T  $\gamma\delta$  activées secrètent des cytokines pro-inflammatoires comme de l'IFN- $\gamma$  ou du TNF- $\alpha$ <sup>278</sup>. Dans certaines conditions, elles peuvent aussi produire de l'IL-4<sup>279</sup>. Certaines cellules T  $\gamma\delta$  (les cellules portant le réarrangement  $\delta$ 1 chez l'homme) sont capables de produire des cytokines particulières comme le « *keratinocyte growth factor* » ou le « *connective tissue growth factor* », leur conférant un rôle bien particulier dans le contrôle de l'intégrité de l'épithélium<sup>280</sup>. Il a enfin été montré que les cellules T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 sont fortement activées *in vitro* par différents micro-organismes comme la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* ou le parasite *Plasmodium falciparum*<sup>281,282</sup>. Enfin, les cellules T  $\gamma\delta$  portant la chaîne V $\delta$ 1 semblent être importantes pour combattre l'infection par le

CMV puisqu'elles sont plus nombreuses dans le sang de contrôles ayant été infectés par le CMV<sup>283</sup>.

## **F. AUTRES LYMPHOCYTES T INNÉS :**

### **1. Les cellules NKT $\gamma\delta$ murines :**

Une population particulière de cellules T  $\gamma\delta$  a été identifiée chez la souris. Il s'agit de la population portant le réarrangement V $\gamma$ 1V $\delta$ 6.3 chez la souris B6. Cette population partage certaines propriétés avec les cellules iNKT, comme une localisation préférentiellement splénique et hépatique<sup>284</sup>, la production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$ <sup>285</sup> et un phénotype activé CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>. On parle de cellules NKT  $\gamma\delta$ . Il a été montré que comme les cellules iNKT, les cellules NKT  $\gamma\delta$  expriment le facteur de transcription PLZF<sup>286</sup>. Ce sont d'ailleurs les seules cellules T  $\gamma\delta$  murines exprimant PLZF. L'absence de PLZF n'entraîne pas de réduction drastique du nombre de cellules NKT  $\gamma\delta$ . Néanmoins, comme pour les cellules iNKT, les cellules NKT  $\gamma\delta$  en l'absence de PLZF ont un phénotype naïf et une production de cytokine altérée. Les cellules NKT  $\gamma\delta$  dépendent aussi de SAP pour leur développement puisque leur proportion et leur nombre est fortement réduit chez la souris SAP KO<sup>286</sup>. Néanmoins, la réduction n'est pas totale, ce qui indique l'existence d'autres voies permettant le développement de ces cellules, contrairement aux cellules iNKT. La population équivalente chez l'homme n'a pas été identifiée. Par ailleurs, toutes les cellules T  $\gamma\delta$  humaines expriment PLZF<sup>108</sup>.

### **2. Cellules T CD8<sup>+</sup> restreintes par H2-M3 chez la souris :**

H2-M3 est une molécule du CMH de classe Ib ayant une affinité toute particulière pour les peptides N-Formyl que l'on retrouve chez les procaryotes. H2-M3 est donc spécialisé dans la présentation de peptides d'origine bactérienne<sup>287</sup>. Ainsi les cellules T CD8<sup>+</sup> reconnaissant des peptide bactériens présentés par H2-M3 sont importantes pour l'immunité contre *Listeria monocytogenes*<sup>288</sup>. Les cellules T CD8<sup>+</sup> restreintes par H2-M3 (appelées HMT dans la suite) présentent des caractéristiques de lymphocytes innés : elles ont un phénotype activé (CD44<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>) même chez des souris naïves<sup>289</sup> et elles produisent rapidement de l'IFN- $\gamma$  suite à une stimulation par CD3<sup>290</sup>. Elles précèdent les cellules T conventionnelles lors de l'infection de souris par *Listeria monocytogenes* et ne participent pas à la réponse

mémoire lors d'une deuxième infection<sup>291</sup>. Cependant, contrairement aux cellules iNKT et aux cellules MAIT, les cellules HMT présentent une diversité de TCR<sup>292</sup>. Des modèles murins ont montré que des ligands endogènes d'origine mitochondrienne peuvent servir pour la sélection positive des cellules HMT<sup>293</sup>. Les HMT présentent la particularité de pouvoir être sélectionnés sur des cellules épithéliales corticales, mais aussi sur des thymocytes<sup>294</sup>. L'acquisition du phénotype activé semble aussi dépendant de la flore, puisque des HMT de souris traitées dès la naissance avec des antibiotiques ont des marqueurs d'activation réduits<sup>295</sup>. Enfin, une étude de 2012 a montré que les cellules HMT sont dépendantes de l'IL-15<sup>296</sup>.

### **3. Cellules T CD4<sup>+</sup> sélectionnées par des interactions thymocyte/thymocyte :**

L'idée que des thymocytes puissent supporter le développement de cellules T a été montrée lorsque des souris Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> ont été greffées avec des progéniteurs de sang de cordon humain. Ces souris ont en effet développé des cellules T CD4<sup>+</sup> humaines. Cependant de manière surprenante, ces cellules ne répondaient pas à des CPA exprimant des CMH de classe II murins, mais humains. Ceci signifie donc que ces cellules se sont développées en utilisant du CMH de classe II humain et par conséquent qu'elles se sont développées sur des thymocytes plutôt que sur les cellules épithéliales corticales (cellules appelées T-T dans la suite)<sup>297</sup>. Pour vérifier si cette voie de développement existe chez la souris, plusieurs groupes ont forcé l'expression du CMH de classe II sur les thymocytes tout en l'empêchant sur les cellules épithéliales corticales. Ces souris transgéniques sont capables de produire des cellules T CD4<sup>+</sup>. Celles-ci sont CD44<sup>+</sup> et ne sont pas des cellules iNKT puisqu'elles n'expriment pas majoritairement NK1.1 en périphérie<sup>298</sup>, et ont un TCR varié<sup>299</sup>. Elles partagent cependant certaines propriétés avec les cellules iNKT. Elles dépendent ainsi de la voie SLAMF6/R/SAP/Fyn pour leur développement<sup>300</sup>, et produisent rapidement de l'IL-4 et de l'IFN-γ *in vitro* et *in vivo*<sup>301</sup>. Ces cellules peuvent aussi exprimer PLZF qui est alors, de la même manière que pour les cellules iNKT responsable de l'acquisition des caractéristiques innées (acquisition du marqueur CD44 et production de cytokines)<sup>302</sup>. Chez l'homme, ce processus a été montré comme étant physiologique. En effet, les thymocytes humains expriment du CMH de classe II<sup>303</sup>, permettant ainsi la sélection de cellules T par des interactions thymocyte/thymocyte. En étudiant l'expression de PLZF dans des thymus et rates fœtaux et néonataux, des chercheurs ont pu mettre en évidence une proportion de cellules T CD4<sup>+</sup> exprimant PLZF (jusque 8% des thymocytes et 15 % des splénocytes)<sup>302</sup>. Les cellules T-T

expriment CD161 et sont de grandes productrices d'IFN- $\gamma$ . Il ne s'agit ni de cellules iNKT ou MAIT, comme le montre leur fréquence bien supérieure à celles de ces cellules, leur non reconnaissance d'un tétramère de CD1d couplé à de l' $\alpha$ GalCer et la diversité de leur TCR. Ces cellules T-T sont plus nombreuses chez le fœtus et deviennent très rares dans le thymus de nouveau-nés.

#### **4. Lymphocytes Intra-épithéliaux CD8 $\alpha\alpha$ :**

La muqueuse intestinale est constamment exposée à des agents microbiens qui peuvent être de réels pathogènes ou des germes commensaux. La défense immunitaire est assurée, entre autres, par un ensemble de lymphocytes T intraépithéliaux (LIE). Les LIE se divisent classiquement en deux groupes sur la base de leur TCR et de leurs corécepteurs. Le type a exprime un TCR  $\alpha\beta$  avec les corécepteurs CD4 ou CD8 $\alpha\beta$ . Le type b (LIEb) exprime un TCR  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$  avec le co-récepteur CD8 $\alpha\alpha$ , et n'exprime pas les co-récepteurs classiques CD4 ou CD8 $\alpha\beta$ . La majorité des LIEb murins ont un phénotype activé/mémoire (CD44<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup>) et expriment des récepteurs de la famille NK comme CD16, NK1.1, Ly49A, Ly49E et Ly49G2<sup>304</sup>. De manière remarquable, les LIEb portant un TCR $\alpha\beta$  sont des cellules autoréactives<sup>305</sup>. Les LIEb dépendent fortement de l'IL-15 produite par les cellules épithéliales intestinales (CIE) pour leur maturation et leur homéostasie dans l'intestin<sup>306</sup>.

#### **5. Cellules T CD8<sup>+</sup> innées chez la souris ITK KO :**

Chez la souris ITK KO, le développement des cellules T CD8<sup>+</sup> est altéré que ce soit dans le thymus ou dans la rate<sup>307</sup>. Les cellules T CD8<sup>+</sup> ont en effet un phénotype mémoire CD24<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> et sont capables de produire rapidement de l'IFN- $\gamma$  suite à une stimulation de leur TCR. Par ailleurs, ces cellules expriment le facteur de transcription Eomes qui est associé à l'expression de CD122, mais n'expriment pas le facteur T-bet qui est classiquement associé à la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules T CD8<sup>+</sup><sup>308</sup>. Enfin tout comme les cellules iNKT, ces cellules T CD8<sup>+</sup> sont sélectionnées non par des cellules épithéliales corticales, mais par des cellules hématopoïétiques et une proportion importante de ces cellules est sélectionnée par des molécules du CMH de classe Ib<sup>309</sup>.

En raison de leur ressemblance avec des cellules innées, ces cellules ont été appelées T CD8 innées<sup>310</sup>. Il a été montré que le développement de ces cellules T CD8<sup>+</sup> innées dépend de l'IL-4<sup>311</sup>. Les cellules iNKT et NKT  $\gamma\delta$  étant de grandes productrices d'IL-4, il a été proposé que les cellules iNKT des deux types puissent être à l'origine de l'apparition des cellules T



CD8<sup>+</sup> innées. En effet, on peut voir une augmentation de l'expression de PLZF dans les thymocytes de la souris ITK KO, ce qui serait cohérent avec une augmentation de l'une ou de ces deux populations de cellules iNKT. Chez la souris ITK, on observe effectivement une expansion de la population de cellules NKT  $\gamma\delta$ <sup>312</sup> alors que la population de cellules iNKT est diminuée avec un blocage au stade 2 de développement<sup>45</sup>. À partir d'expériences de chimères ou de souris doubles KO, plusieurs équipes ont montré que les cellules T CD8<sup>+</sup> innées dans la souris ITK KO sont dépendantes de PLZF et de SAP<sup>311,313</sup> ce qui est compatible avec la nécessité de ces deux facteurs pour avoir une population de cellules NKT (iNKT ou NKT  $\gamma\delta$ ). Enfin, ces cellules sont également dépendantes de l'IL-15<sup>310</sup>. Chez l'homme, l'étude de cette population de cellules T CD8<sup>+</sup> innées n'a pas été faite chez les patients mutés pour ITK. Néanmoins, chez les deux premières patientes décrites, la quantification de l'ARNm d'Eomes dans les cellules CD8<sup>+</sup> des patients montre une très forte surexpression par rapport aux contrôles<sup>101</sup>. Ceci pourrait correspondre à l'apparition chez ces patientes de cette population de cellules T CD8<sup>+</sup> innées.

L'observation de cette population de cellules T CD8<sup>+</sup> innée s'est faite dans des modèles de souris déficientes. La question de l'existence physiologique de cette population se pose alors. De manière intéressante, les différentes lignées de souris de laboratoire ont un nombre variable de cellules iNKT. Ainsi, la souris B6 est celle qui en a le moins alors que la souris BALB/c en possède le plus. De manière concordante, et à l'inverse de la souris B6, on retrouve chez la souris BALB/c une population CD8<sup>+</sup> Eomes<sup>+</sup>T-bet<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> qui produit de l'IFN- $\gamma$ . De la même manière que chez la souris ITK KO, cette population de cellules T CD8<sup>+</sup> innée dépend de l'IL-4 et de la présence des cellules iNKT<sup>311</sup>. Des populations similaires de cellules T CD8<sup>+</sup> innées ont été mises en évidence dans d'autres modèles de souris avec des mécanismes similaires de développement : les souris SLP76 :Y145F, Klf2<sup>fl/fl</sup>Cd4<sup>Cre</sup>, Cbp<sup>fl/fl</sup>Lck<sup>Cre</sup> et Id3<sup>-/-</sup><sup>314</sup>. Selon le modèle, on a une expansion de la population iNKT ou NKT  $\gamma\delta$  qui permet l'apparition de la population de cellules T CD8<sup>+</sup> innées grâce à leur production d'IL-4.

Il existe donc chez l'homme ou chez la souris d'autres cellules T qui ont un phénotype inné. Ces cellules peuvent présenter les particularités d'être sélectionnées sur des cellules hématopoïétiques, d'être autoréactives, de dépendre de la voie SAP, de PLZF et de l'IL-15.



**G. LES DÉFICITS IMMUNITAIRES PRIMITIFS : INTÉRÊT POUR L'ÉTUDE DES COMPOSANTS DU SYSTÈME IMMUNITAIRE :**

La compréhension du fonctionnement du système immunitaire, du rôle de ses différents composants, de leurs interactions, a notamment été permise par l'étude des déficits immunitaires primitifs. Par exemple, l'étude des déficits immunitaires combinés sévères a permis de souligner le rôle fondamental de l'immunité cellulaire dans la défense contre les infections virales et les infections opportunistes. De plus, la découverte d'anomalies génétiques à l'origine de ces déficits a permis une meilleure compréhension des étapes de la lymphopoïèse<sup>315</sup>.

Par ailleurs, il a pu être montré que certaines pathologies étaient en rapport avec des anomalies d'homéostasie du système immunitaire. C'est le cas des lympho-histiocytoses familiales (FHL). Chez les patients atteints, il existe au cours d'une infection virale une expansion importante du compartiment T CD8<sup>+</sup> qui persiste au cours du temps, alors que chez un sujet sain cette phase d'expansion est suivie d'une phase de contraction après la lyse des cellules infectées. La persistance d'une réponse CD8<sup>+</sup> importante entraîne, par le biais de sécrétion de cytokines, une activation des macrophages, qui vont provoquer des lésions tissulaires, et phagocyter des éléments figurés du sang. Ce phénomène s'appelle « *Hemophagocytic lymphohistiocytosis* » (HLH). En l'absence de traitement spécifique, l'issue de ce processus peut être fatale. L'étude des familles atteintes a permis de mettre en évidence des mutations de gènes codant des protéines importantes pour la fonction cytotoxique des lymphocytes T. Ces protéines sont impliquées dans la voie d'exocytose des granules cytotoxiques ou participent à l'activité cytotoxique des granules. Il existe actuellement 6 gènes dont les mutations entraînent ce type d'anomalies, codant pour des protéines intervenant dans la lyse cellulaire (perforine), l'arrimage et la fusion des granules à la membrane (Munc13-4, syntaxine 11, Munc18-2, Rab27a) ou encore le trafic des granules (LYST)<sup>316</sup>. Ainsi, au cours d'une infection virale, le défaut de cytotoxicité des cellules T CD8<sup>+</sup> entraîne une persistance de l'infection, une persistance de l'activation T, qui entraîne à son tour une activation des macrophages. Au cours de ces pathologies, le facteur déclenchant « classique » est une infection virale. Différents virus peuvent être impliqués. Cependant, l'infection n'est parfois pas identifiée. Une pathologie au cours de laquelle survient une hémophagocytose, mais uniquement chez des garçons, le syndrome de Purtilo, a été rapproché de ces FHL, mais comporte certaines particularités.

## **H. LE SYNDROME DE PURTILO OU SYNDROME LYMPHOPROLIFERATIF LIE A L'X (XLP):**

### **1. Historique :**

Ce syndrome a été décrit pour la première fois en 1975 par le docteur Purtilo qui rapportait le cas de la famille Duncan dans laquelle six garçons âgés de 2 à 19 ans étaient décédés des suites d'une immunodéficience combinée variable. L'histoire de cette famille était particulière car 3 des 6 garçons étaient décédés par la suite d'une primo-infection par le virus EBV, réalisant un tableau de « mononucléose infectieuse fatale ». En effet, la primo-infection EBV, qui est habituellement asymptomatique ou entraîne des symptômes modérés (tels que fièvre, odynophagie et hépatosplénomégalie) d'évolution spontanément favorable, s'était compliquée d'un syndrome d'activation lympho-histiocytaire, comme l'attestait la présence à l'autopsie d'une infiltration diffuse et massive des organes hématopoïétiques, des intestins et du système nerveux central par des lymphocytes et des macrophages. Deux autres garçons étaient décédés d'un lymphome (de localisation iléale pour l'un, et cérébrale pour l'autre) et plusieurs patients avaient une hypogammaglobulinémie. Initialement appelée maladie de Duncan ou syndrome de Purtilo, la maladie a été renommée syndrome lymphoprolifératif lié à l'X ou XLP une fois le mode de transmission lié à l'X établi<sup>317,318</sup>. Deux causes génétiques ont depuis été identifiées et ont donné lieu à l'appellation XLP-1 et XLP-2.

### **2. Le XLP de type 1 (XLP-1) causé par des mutations dans *SH2D1A* :**

En 1998, trois équipes ont mis en évidence chez des patients atteints de XLP des mutations hémizygotes du gène *SH2D1A* codant pour la protéine SAP<sup>319,320</sup>. Le déficit en SAP a été dénommé XLP-1.

#### **a) Description fondamentale de SAP :**

SAP est une molécule de 128 acides aminés constituée d'un domaine SH2 et d'une courte queue C-terminale. SAP et ses homologues, *Ewing Sarcoma-associated transcript-2* (EAT-2) et *EAT-2-related transducer* (ERT) sont tous les trois capables de réguler l'activité des SLAM-R. Cette famille comprend six membres : SLAM, 2B4, NTB-A, CRACC, CD84 et Ly9. Ces récepteurs sont tous constitués d'un domaine extracellulaire contenant deux domaines *Ig-like* (à l'exception de Ly9 qui en contient 4), un domaine transmembranaire et

une queue cytoplasmique contenant au moins 2 résidus tyrosines au sein de motifs « *immunotyrosine switch motifs* » (ITSM). Ces ITSM sont conformes à la séquence consensus TxYxxV/I et sont capables d'interagir avec SAP et d'autres molécules contenant un domaine SH2<sup>321</sup>. A l'exception de 2B4 qui se lie à CD48, les récepteurs de la famille SLAM sont leur propre ligand. De par sa liaison aux SLAM-R, SAP peut entrer en compétition avec d'autres protéines contenant des domaines SH2 comme SHP-1, SHP-2, SHIP-1 et Csk qui ont la capacité d'interagir avec les SLAM-R<sup>322</sup>. SAP a également une fonction adaptatrice vis-à-vis des SLAM-R en se liant au domaine SH3 de la tyrosine kinase FynT, permettant ainsi son recrutement aux SLAM-R<sup>323,324</sup>. Ainsi, SAP active FynT et permet la phosphorylation des résidus tyrosines contenus dans les domaines intra-cellulaires des SLAM-R. D'un point de vue structurel, SAP possède deux surfaces d'interaction. La première qui contient l'arginine 32 permet la liaison aux SLAM-R. La seconde contient l'arginine 78 qui fixe FynT<sup>323</sup>. En 2006, une étude de Chen R. a montré que la liaison de SAP et FynT n'est possible que si les SLAM-R sont engagés avec leur ligand. SAP se fixe alors aux récepteurs et change de conformation exposant l'arginine 78 permettant la fixation de FynT<sup>325</sup>.

#### **b) Expression de SAP :**

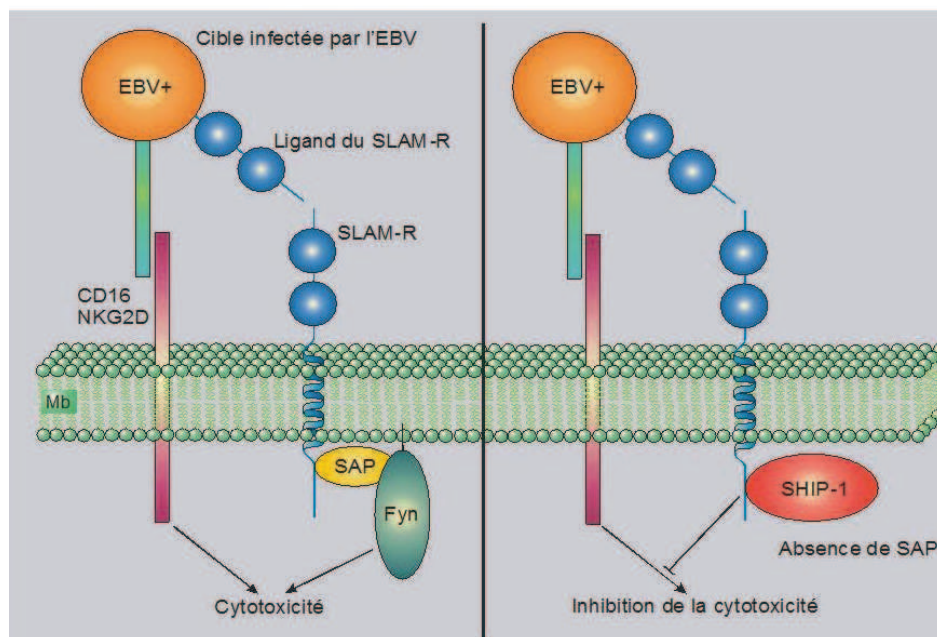
SAP est exprimée dans les lymphocytes T, les cellules NK, les cellules iNKT mais pas dans les neutrophiles, les monocytes ou les cellules B<sup>326</sup>. L'expression de SAP est modulée suite à l'activation lymphocytaire et augmente dans les lymphocytes T humains après une stimulation par un anti-CD3 ou par des mitogènes *in vitro*<sup>327,328</sup>. Cette augmentation est aussi observée *in vivo* suite à l'infection par l'EBV<sup>329</sup>.

#### **c) Défauts cellulaires associés à un déficit de SAP :**

Les défauts liés à l'absence de SAP sont similaires chez la souris et l'homme. De nombreux travaux ont permis de décrypter le rôle de SAP et des récepteurs associés dans le développement et la fonction de différents lymphocytes. Comme vu plus haut, le développement des cellules iNKT est dépendant de SAP chez l'homme et la souris. SAP est en effet nécessaire à la signalisation des récepteurs SLAM, tout particulièrement de SLAM et de NTB-A. Ainsi, la souris SAP KO n'a pas de cellules iNKT tout comme les patients XLP-1<sup>94,330</sup>. En l'absence de SAP, les cellules NK et T CD8<sup>+</sup> sont en nombre normal<sup>94</sup>. Cependant, leur cytotoxicité est réduite quand elles sont co-stimulées par les récepteurs NTB-A ou 2B4<sup>331,332</sup>. De manière intéressante, les ligands respectifs de ces récepteurs (NTB-A et CD48)

sont surtout exprimés par des cellules hématopoïétiques<sup>333</sup>. Cette inhibition est dépendante de l'expression par les cibles des ligands des SLAM-R<sup>334</sup>. L'étude des cellules NK et T CD8<sup>+</sup> de patients XLP-1 a montré que, sans SAP, l'action normalement activatrice de 2B4 et NTB-A devient inhibitrice pour la cytotoxicité vis-à-vis de cibles B infectées par l'EBV<sup>331,332</sup>.

Le même type de phénomène se retrouve chez la souris SAP KO qui présente un défaut de cytotoxicité de ses cellules NK lorsqu'elles sont stimulées par CD48<sup>335</sup>. Le phénotype est accentué chez la souris déficiente pour les trois adaptateurs de la famille SAP (SAP, EAT-2 et ERT)<sup>336</sup>. Une réduction drastique de la cytotoxicité est observée chez la souris triple KO lorsque la cible est d'origine hématopoïétique. Cette spécificité est due à l'expression par les cellules hématopoïétiques de ligands des SLAM-R. Ainsi, en l'absence des adaptateurs de la famille SAP, 2B4, NTBA, Ly9, CD84 et CRACC deviennent inhibiteurs de l'activité cytotoxique des cellules NK stimulées par NKG2D ou CD16. Même si le mécanisme d'inhibition en l'absence de SAP n'est pas totalement compris, une étude biochimique a dans le cas de 2B4 permis de montrer qu'en l'absence des adaptateurs de la famille SAP, l'activation de 2B4 par CD48 conduit à une phosphorylation de SHIP-1 qui est réduite en présence de SAP, EAT-2 et ERT. La figure 8 montre alors une explication possible au défaut de cytotoxicité observé en l'absence de SAP contre une cellule B/EBV. En se basant sur les études murines, on peut penser que l'absence de SAP permet le recrutement par les SLAM-R de molécules inhibitrices de la cytotoxicité comme SHIP-1.



**Figure 8 : Inhibition de la cytotoxicité en l'absence de SAP.** Cette figure représente une possibilité se basant sur des études murines pour expliquer le défaut de cytotoxicité observé en l'absence de SAP contre une cible infectée par l'EBV. Figure d'après <sup>316</sup>.

Par ailleurs, même si SAP n'est pas exprimée par les cellules B, on constate une diminution du nombre de cellules B mémoires associée à un défaut de commutation isotypique des immunoglobulines chez les patients XLP-1. On retrouve aussi une diminution des centres germinatifs dans leur rate, structures indispensables au bon développement des cellules B mémoires switchées<sup>337</sup>. L'IL-10 est une cytokine nécessaire à la survie et à la différenciation des cellules B. Le défaut de production d'IL-10 par les cellules T CD4<sup>+</sup> observées chez les patients SAP, lié à un défaut d'expression d'ICOS sur les cellules T CD4<sup>+</sup><sup>338</sup>, peut donc expliquer l'absence de cellules mémoires switchées chez les patients XLP-1. Ces défauts T n'étant pas liés à l'infection par l'EBV, l'hypogammaglobulinémie peut être antérieure à l'infection par l'EBV<sup>339</sup>. La souris SAP KO présente également une diminution des lymphocytes B mémoires et une hypogammaglobulinémie, en rapport avec une altération de la fonction des cellules T CD4<sup>+</sup><sup>340</sup>. L'utilisation de modèles murins a permis de mettre en évidence un contact réduit entre les cellules T CD4<sup>+</sup> FH et les cellules B dans la rate<sup>341</sup>. En 2010, il a été montré que les interactions T/B dans la rate sont dépendantes des récepteurs CD84 et NTB-A<sup>342</sup>. De manière intéressante, la formation des centres germinatifs est restaurée chez la souris SAP KO/NTB-A KO indiquant que le recrutement de SHP-1 par NTB-A en l'absence de SAP est majoritairement responsable du contact réduit entre cellules T CD4<sup>+</sup> FH et cellules B<sup>97</sup>.

Enfin, plusieurs études confèrent un rôle pro-apoptotique à SAP. Ainsi, Chen et al. ont montré que chez la souris SAP KO l'apoptose des cellules T CD8<sup>+</sup> est réduite<sup>343</sup>. Le même type de résultats a ensuite été montré chez l'homme<sup>344,345</sup>. L'expression augmentée de SAP dans les cellules T activées<sup>328</sup> pourrait ainsi participer à l'apoptose des cellules surnuméraires lors de la contraction de la réponse immunitaire.

La capacité moindre des cellules NK et des cellules T CD8<sup>+</sup> à tuer des cellules infectées par l'EBV peut ainsi résulter en une activation prolongée des cellules cytotoxiques, ce qui pourrait entraîner le HLH. Le rôle pro-apoptotique de SAP pourrait aussi intervenir dans l'apparition du HLH chez les patients XLP-1. En effet, suite à l'infection par l'EBV, la contraction de la réponse immunitaire pourrait se faire moins efficacement à cause d'une apoptose réduite.

### **3. Le XLP de type 2 (XLP-2) causé par des mutations dans *XIAP* :**

En 2006, notre équipe a mis en évidence une seconde anomalie génétique à l'origine des syndromes XLP chez des patients ne portant pas de mutation de *SH2D1A*. Dans trois

familles au sein desquelles plusieurs garçons avaient une pathologie évocatrice d'un XLP, des mutations du gène *XIAP* ont été mises en évidence<sup>346</sup>. Ce gène code pour la protéine XIAP (*X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein*) qui appartient à la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP pour *Inhibitor of Apoptosis Proteins*). Le déficit en XIAP a été dénommé XLP-2. Dans le XLP-2, comme dans le XLP-1, le syndrome hémophagocytaire déclenché par l'EBV est la manifestation clinique la plus fréquente. Néanmoins, les deux déficits présentent des différences cliniques<sup>347</sup>. Tout d'abord, la survenue de lymphomes, associés ou non à l'EBV, observée chez 30% des patients atteints de XLP-1, n'a jamais été rapportée chez les patients atteints de XLP-2. Une autre différence importante est l'existence de colites hémorragiques chez 25% des patients XLP-2, alors que cette complication n'est pas rapportée au cours du XLP-1. D'un point de vue histologique, les anomalies associées à cette colite hémorragique vont d'un aspect inflammatoire non spécifique à des lésions granulomateuses comme celles observées au cours de la maladie de Crohn. Les deux syndromes présentent également des différences au niveau de la physiopathologie. Ainsi l'hémophagocytose rencontrée au cours du syndrome XLP-1 peut être attribuée à un défaut de cytotoxicité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et NK (de par une mauvaise signalisation des SLAMF-R), rapprochant ce syndrome des lymphohistiocytoses familiales. Pour le moment, chez les patients déficients en XIAP, aucun défaut de cytotoxicité n'a été rapporté, posant la question de la physiopathologie de ce syndrome.

#### **a) La protéine XIAP :**

XIAP est une protéine de 497 acides aminés chez l'homme, contenant trois domaines BIR (*Baculovirus IAP repeats*), un domaine UBA (*Ubiquitin Binding*) et un domaine RING (*Really Interesting New Gene*) finger ayant une activité d'ubiquitine ligase. L'expression de XIAP est ubiquitaire. Le rôle le mieux décrit de XIAP est un rôle dans le phénomène d'apoptose. Avant d'aborder ce rôle antiapoptotique de XIAP, nous ferons quelques rappels sur l'apoptose.

### **I. L'APOPTOSE :**

#### **1. Généralités :**

L'apoptose est un processus physiologique par lequel les cellules surnuméraires, non-fonctionnelles ou indésirables sont éliminées de l'organisme. De cinquante à soixante-dix



milliards de cellules meurent ainsi chaque jour chez un adulte. L'apoptose est un processus de mort programmée et correspond à une mort silencieuse. L'intégrité de la membrane plasmique est maintenue pendant tout le processus (à la différence de ce qui se produit lors de la nécrose), empêchant le déclenchement d'une réponse inflammatoire. La marginalisation et la condensation de la chromatine le long de la membrane nucléaire aboutissent à la dégradation de l'ADN en fragments de haut poids moléculaire. Des corps apoptotiques contenant une partie du cytoplasme, des organites et des fragments nucléaires sont ensuite formés par bourgeonnement de la membrane plasmique. Simultanément, on observe une réorientation des molécules de phosphatidylsérines du feuillet interne de la membrane plasmique vers le feuillet externe. L'exposition de ces phospholipides à la surface de la membrane va permettre la reconnaissance puis la phagocytose de ces corps apoptotiques par les macrophages présents dans le tissu environnant<sup>348</sup>. Cette mort programmée de la cellule nécessite l'intervention d'acteurs spécialisés parmi lesquels on retrouve les caspases.

## **2. Les caspases, les molécules effectrices de l'apoptose :**

Les caspases sont les éléments centraux de la réponse apoptotique. Elles doivent leur nom à leurs propriétés catalytiques : *cysteine-aspartic acid specific proteases*. Les caspases sont en effet des protéases à cystéine et clivent leur substrat au niveau d'un site consensus constitué d'un acide aspartique en position 1 en C-terminale : XXX/Asp<sup>349</sup>. Leur rôle dans l'exécution d'un signal de mort a été mis en évidence lors de l'identification et du clonage du gène pro-apoptotique *ced-3* du ver *Caenorhabditis elegans*. La première caspase humaine identifiée est l'*interleukine-1 $\beta$  processing enzyme*<sup>350</sup>. Il y a 14 caspases identifiées chez les mammifères. On retrouve les caspases 1 à 10 et 14 chez l'homme. Parmi les caspases identifiées chez l'homme, sept ont un rôle avéré dans l'apoptose. Il s'agit des caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10<sup>351</sup>.

Les caspases sont exprimées sous forme de pro-enzymes inactives qui contiennent trois domaines : un prodomaine N-terminal, une grande sous-unité contenant le site actif à cystéine et une petite sous-unité C-terminale. Un site de clivage contenant un acide aspartique sépare le prodomaine de la grande sous-unité (d'une taille d'environ de 20 kDa). Enfin un linker contenant un ou deux acide aspartiques lie la grande à la petite sous-unité (d'une taille d'environ de 10 kDa). La présence d'acide aspartique au niveau des domaines de liaisons entre les trois parties des caspases permet l'auto-activation des caspases ou l'activation par d'autres caspases lors de boucles d'amplification. Les caspases sont rendues complètement

actives par deux clivages. Le premier clivage sépare grande et petite sous-unité. Le deuxième clivage sépare le prodomaine N-terminal. La caspase active est alors constituée d'un tétramère contenant deux petites et deux grandes sous-unités<sup>352</sup>. On peut différencier les caspases selon la taille de leur prodomaine :

- Les caspases à long prodomaine correspondent aux caspases initiatrices ou régulatrices. Ce groupe contient les caspases 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, et 13.

- Les caspases à prodomaine court : Il s'agit de caspases effectrices. Ce sont les caspases 3, 6, 7 et 14. Elles sont activées par clivage par d'autres caspases ou par le granzyme B<sup>353</sup>.

Au cours de l'apoptose, les caspases initiatrices vont être rendues actives par l'intégration de signaux de mort. Elles vont à leur tour cliver les caspases effectrices qui vont cliver leurs substrats<sup>354</sup>. Ceux-ci sont au nombre de plusieurs centaines et sont divers : protéines de la réparation, du métabolisme, protéines du cytosquelette ou encore lamines nucléaires<sup>355</sup>.

### **3. Les deux voies de déclenchement de l'apoptose :**

#### **a) La voie intrinsèque de l'apoptose ou voie mitochondriale :**

La voie intrinsèque de l'apoptose est déclenchée suite à de nombreux signaux comme des dommages de l'ADN, des drogues, du stress oxydatif ou un sevrage en cytokine. L'apoptose mitochondriale est régulée par des interactions moléculaires entre différents membres de la famille Bcl-2. Les membres de cette famille peuvent être divisés en protéines anti- et pro-apoptotiques. Les protéines anti-apoptotiques sont Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1, Bcl-w et A1. Les membres pro-apoptotiques comptent Bax, Bak et Bok, Bim, Bmf, PUMA, NOXA, Bad et Bid. L'intégration de signaux de mort va conduire à l'expression de Bim et de PUMA<sup>356</sup> qui sont transloquées à la membrane mitochondriale. Elles interagissent alors avec Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub>, libérant ainsi Bax et Bak qui forment des pores dans la mitochondrie et permettent le relargage d'un ensemble de molécules pro-apoptotiques appelées « *soluble inter membrane mitochondrial proteins* » (SIMP) de la mitochondrie vers le cytoplasme. Parmi ces protéines, on trouve le cytochrome c et l'*Apoptosis peptidase activating factor-1* (Apaf-1). Apaf-1 en l'absence de signal apoptotique est sous forme repliée. Une fois libéré dans le cytosol, Apaf-1 lie le cytochrome c et adopte une configuration dépliée. Suite à ce changement de conformation et en présence d'ATP, Apaf-1 est capable de s'heptamériser



pour former une structure appelée apoptosome. Ce complexe recrute et active alors la procaspase-9 qui ainsi activée va à son tour cliver la pro-caspase3 et ainsi initier la cascade apoptotique<sup>357</sup>.

#### **b) La voie extrinsèque ou la voie des récepteurs de mort :**

La voie extrinsèque déclenche l'apoptose suite à la liaison par des récepteurs de mort de leur ligand. Les récepteurs de mort font partie de la superfamille de récepteurs du TNF et sont caractérisés par des domaines extracellulaires riches en cystéine importants pour l'interaction récepteur/ligand<sup>358</sup>. Tous ces récepteurs de mort contiennent également une séquence cytoplasmique homologue appelée *Death Domain* (DD) qui sert à la transduction du signal de mort. C'est le cas du récepteur Fas (CD95) et des récepteurs TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2 (DR5)<sup>359,360</sup>.

Fas est largement exprimé à la surface des cellules de l'organisme avec une expression plus importante sur les lymphocytes T<sup>361</sup>. L'expression du ligand de Fas, FasL, est restreinte à certains types cellulaires comme les cellules T activées<sup>362</sup> et les cellules NK<sup>363</sup>. La liaison de FasL à Fas induit la trimérisation du récepteur Fas. Ce trimère peut alors fixer la protéine adaptatrice *Fas-associated death domain protein* (FADD) via sa région cytoplasmique. FADD recrute alors la procaspase 8. L'ensemble Fas/FADD/Procaspace 8 forme ce que l'on appelle le *Death-inducing signaling complex* (DISC). La formation du DISC conduit à l'autoclivage de la procaspase 8. La caspase 8 activée est alors relâchée dans le cytosol et déclenche une cascade protéolytique faisant intervenir la caspase 3 et Bid, ce qui conduit à l'apoptose<sup>348</sup>.

. La caspase 10 est aussi recrutée au niveau du DISC, mais son rôle semble moindre que celui de la caspase 8<sup>364</sup>.

DR4 et DR5 peuvent lier un ligand commun, TRAIL qui induit leur trimérisation et le recrutement du DISC, comme dans le cas de la stimulation de Fas par FasL et ainsi l'induction de l'apoptose<sup>365-367</sup>.

Les composants du DISC sont présents dans le cytoplasme mais l'apoptose n'est initiée que suite à la réception par la cellule d'un signal de mort. Cela permet de déclencher très rapidement, si besoin est, la voie apoptotique puisque les protéines de signalisation sont déjà synthétisées.

#### **4. Apoptose dans le système immunitaire périphérique :**

L'apoptose permet le contrôle de l'homéostasie lymphocytaire et de la tolérance centrale et périphérique. Il existe deux principaux mécanismes d'élimination des cellules T en périphérie : la mort cellulaire induite par l'activation (AICD pour *Activation Induced Cell Death*), et la mort autonome des lymphocytes T activés (ACAD pour *Activated T Cells Autonomous Death*). L'activation optimale d'une cellule T naïve se fait lors de la reconnaissance d'un complexe CMH/antigène par le TCR et en présence de molécules co-stimulatrices sur une CPA. Cette reconnaissance déclenche l'expansion des cellules T, la rapide production d'IL-2 et l'augmentation de l'expression de surface du récepteur de haute affinité à l'IL-2, CD25. En plus d'autres facteurs, l'abondance relative de l'antigène et de l'IL-2 dans l'environnement des cellules T va alors décider de leur survie ou de leur entrée en apoptose<sup>368</sup>.

##### **a) AICD :**

Quand l'antigène et l'IL-2 sont abondants, la réactivation du TCR d'une cellule T activée peut déclencher le processus autorégulateur d'AICD. Ce phénomène a été observé la première fois dans des cultures d'hybridomes mis en présence de CPA<sup>369</sup>. L'AICD nécessite la présence d'IL-2 et est ainsi un mécanisme d'autorégulation négative dans le contexte d'une réponse immunitaire. Ce processus d'élimination antigène-spécifique permet de limiter les effets délétères d'une expansion excessive de cellules T effectrices (auto-immunité, hyperactivation non spécifique...). De manière concordante, les souris déficientes en IL-2 ou IL-2R développent des cellules T autoréactives clonales<sup>370,371</sup>. Le récepteur Fas a par la suite été impliqué de manière formelle dans l'AICD par plusieurs études montrant que la stimulation du TCR de cellules T induit l'expression de FasL à la surface des cellules et que le blocage de l'interaction Fas/FasL protège les cellules de l'AICD<sup>372</sup>. FasL n'est d'ailleurs pas exprimé par des lymphocytes à l'état quiescent, mais son expression est induite par l'activation du TCR de manière IL-2 dépendante<sup>373</sup>.

##### **b) ACAD :**

Il existe un autre mécanisme de contraction de la réponse immunitaire qui intervient une fois que le pathogène a été éliminé et que le niveau d'IL-2 dans la circulation diminue : il s'agit du phénomène d'ACAD. L'ACAD dépend de la voie intrinsèque de l'apoptose. La déprivation en IL-2 entraîne en effet la diminution de l'expression de Mcl-1. Cette diminution

libère Bim et lui permet d'activer Bax et Bak qui vont provoquer le relargage des SIMP par la mitochondrie et ainsi provoquer l'apoptose de la cellule<sup>374</sup>.

L'AICD et l'ACAD sont les deux voies d'apoptose permettant la régulation de la population de lymphocytes T activés et potentiellement dangereux pour l'organisme une fois une réponse immunitaire terminée.

## **5. La régulation de l'apoptose :**

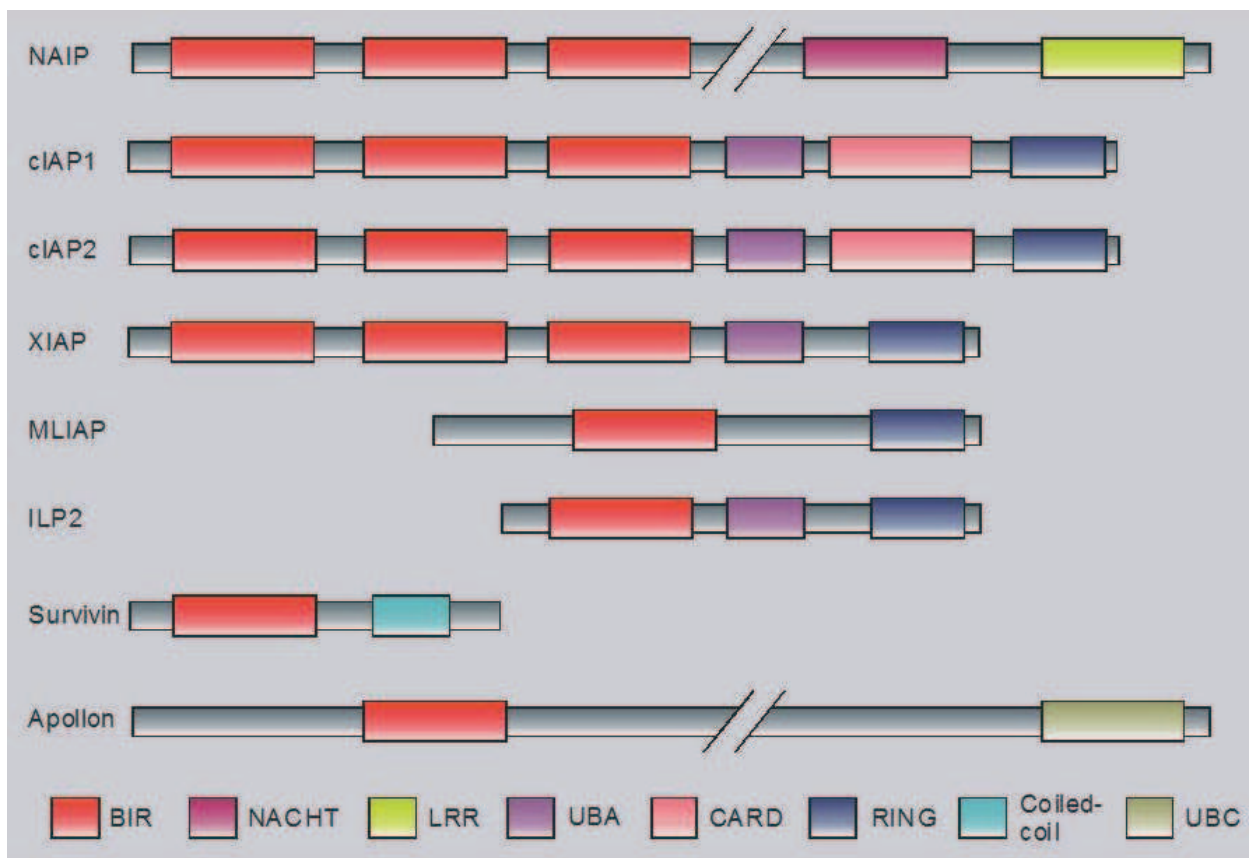
Il est indispensable que l'apoptose soit régulée pour éviter un défaut ou un excès d'apoptose qui sont délétères pour l'organisme. Il existe plusieurs mécanismes de régulation de l'apoptose qui interviennent à différents niveaux. Tout d'abord, la molécule c-FLIP est un compétiteur de la caspase 8 au niveau du DISC<sup>375</sup>. Par ailleurs, l'expression de récepteurs leurres ou *decoy receptors* (DcR) est un autre moyen mis en place par la cellule pour réguler l'activation de l'apoptose. TRAIL reconnaît ainsi DcR1 et à DcR2<sup>376,377</sup>. Ces deux récepteurs n'ont pas la queue cytoplasmique nécessaire à la transduction du signal en aval. Il existe aussi un récepteur leurre de FasL, DcR3, exprimé sous forme soluble et capable d'inhiber l'apoptose en empêchant la liaison de FasL à Fas. La voie mitochondriale est quant à elle finement régulée par les membres de la famille Bcl-2. Enfin, il existe un autre mécanisme de régulation de l'apoptose à la fois sur la voie extrinsèque et sur la voie intrinsèque : il s'agit de la famille des IAP.

### **a) Les IAP :**

La découverte des IAP débute en 1993 avec celle de la protéine virale IAP du baculovirus qui a la propriété d'inhiber l'apoptose de cellules d'insectes infectées<sup>378</sup>. Depuis, des homologues ont été identifiés chez la levure, les nématodes, la drosophile et les vertébrés supérieurs. Les membres de cette famille sont caractérisés par la présence d'un nombre variable de motifs BIR. Les BIR sont une séquence d'environ 70 acides aminés qui contient le motif caractéristique CX<sub>2</sub>CX<sub>6</sub>HX<sub>6</sub>C capable de fixer un zinc via des résidus histidine et cystéine. Il y a trois domaines BIR, nommés BIR1, BIR2 et BIR3 classés selon leur évolution phylogénétique. Les IAP peuvent contenir d'autres domaines structuraux comme un domaine RING qui possède une activité E3 ubiquitine ligase permettant la dégradation de protéines cibles via le protéasome ou un domaine CARD (*caspase activation recruitment domain*) qui permet des interactions protéine/protéine. Les IAP peuvent aussi avoir un domaine *UBiquitinating Associated* (UBA) qui permet de lier des monomères ou des polymères d'ubiquitine. Enfin,

on peut aussi retrouver dans certaines IAP un domaine *UBiquitin-Conjugating* (UBC), un domaine riche en Leucine (LRR), un domaine NACHT ou un domaine coiled-coil<sup>379</sup>.

Chez l'homme, la famille des IAP compte 8 membres qui ont de 1 à 3 domaines BIR dans leur domaine N-terminal. Il s'agit des protéines NAIP (*neuronal apoptosis-inhibitory protein*), cIAP1 (*cellular inhibitor of apoptosis protein 1*), cIAP2 (*cellular inhibitor of apoptosis protein 2*), XIAP (*X-linked IAP*), Survivin, Bruce, ML-IAP (*melanoma-IAP*), ILP2 (*IAP-like Protein*), aussi appelées BIRC1 à 8 respectivement<sup>380</sup>. La figure 9 représente la structure des IAP humaines. Les trois IAP les plus étudiées sont XIAP, cIAP1 et cIAP2.



**Figure 9 : Structure des IAP humaines.** La famille humaine des IAP compte huit membres. Le point commun est la présence de un à trois domaines BIR. Les trois IAP les mieux connues sont cIAP1, cIAP2 et XIAP. Figure issue de <sup>379</sup>.

Il a été montré que les IAP sont capables d'inhiber l'apoptose que ce soit par la voie intrinsèque ou extrinsèque<sup>381</sup>. Il a initialement été pensé que les IAP exerçaient leur fonction anti-apoptotique *in vivo* en se liant directement aux caspases. Il a néanmoins été montré par la suite que seule XIAP est capable de se lier directement aux caspases 3, 7 et 9<sup>382</sup>.

XIAP se lie ainsi à la caspase 9 par son domaine BIR3. Celui-ci se fixe à la partie N-terminale de la petite sous-unité de la caspase 9 activée. La liaison de XIAP à la sous-unité de

la caspase 9 activée empêche la dimérisation de celle-ci et donc son activité catalytique<sup>383,384</sup>. Pour les caspases 3 et 7, leur inhibition par XIAP fait intervenir la région linker entre les domaines BIR1 et BIR2 de XIAP. Ce linker se lie au site de fixation des substrats des caspases 3 et 7 activées. Le BIR2 de XIAP peut aussi interagir avec les parties N-terminales des caspases 3 et 7 activées<sup>385-387</sup>. Par ailleurs, des études ont montré que XIAP est capable d'ubiquitiner *in vitro* les caspases 3, 7 et 9 et *in vivo* la caspase 3<sup>388</sup>. L'inhibition des caspases 3, 7 et 9 par XIAP *in vitro* ou dans des conditions de surexpression ne nécessite pas de domaine RING fonctionnel<sup>389</sup>. Néanmoins, celui-ci est important pour avoir une activité anti-apoptotique complète *in vivo*<sup>390</sup>. XIAP peut donc inhiber le fonctionnement des caspases d'au moins deux façons : en se liant directement à elles ou en entraînant leur dégradation.

Contrairement à XIAP, cIAP1 et cIAP2 ne peuvent pas se lier de manière directe aux caspases<sup>382</sup>. Néanmoins, elles jouent un rôle dans l'inhibition des caspases en se liant avec une forte affinité à la molécule Smac (cf. paragraphe suivant), l'empêchant ainsi d'inhiber l'action de XIAP. De plus, cIAP1 et cIAP2 sont capables par leur domaine RING d'ubiquitiner les caspases 3 et 7<sup>391</sup>. Enfin, cIAP1 est capable d'ubiquitiner Smac entraînant ainsi sa dégradation<sup>392</sup>.

#### **b) Régulation des IAP :**

Les IAP sont hautement régulées au sein de la cellule. Celle-ci doit en effet entrer en apoptose si nécessaire, mais doit pouvoir survivre à des défauts mineurs et réparables. Les inhibiteurs endogènes d'IAP ont tout d'abord été découverts chez la drosophile<sup>393</sup>. Chez les mammifères, six protéines ont été identifiées comme inhibiteur des IAP : Smac, Omi/HtrA2, ARTS, XAF-1, Nrdp1 et NRAGE<sup>379</sup>. Les inhibiteurs d'IAP les mieux connus sont Smac et Omi/HtrA2. Suite au déclenchement de l'apoptose, Smac et Omi/HtrA2 sont relâchées de la mitochondrie dans le cytosol. Smac peut se lier aux BIR2 et BIR3 de XIAP l'empêchant ainsi de lier les caspases<sup>394,395</sup>. Omi/HtrA2 est elle aussi capable de se lier à XIAP et d'empêcher son action antiapoptotique<sup>396</sup>.

XIAP peut par ailleurs s'auto-ubiquitiner en réponse à des signaux apoptotiques ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome<sup>388,397</sup>. Par ailleurs, cIAP1 est aussi en mesure d'ubiquitiner cIAP2 et XIAP<sup>398</sup> ce qui permet probablement d'avoir une régulation fine de la balance entre les différentes IAP au sein de la cellule. Enfin, il a été montré que XIAP est un des substrats des caspases activées et que le déclenchement de l'apoptose peut conduire au clivage de XIAP<sup>389</sup>.

La protéine XIAP est donc un inhibiteur puissant de l'apoptose. D'ailleurs, on la retrouve surexprimée dans de nombreux cancers<sup>379</sup> et de nombreuses études ont montré que XIAP est une cible thérapeutique dans le traitement de différents cancers. C'est pourquoi une déficience en XIAP peut expliquer l'absence de lymphomes chez les patients XLP-2 alors que ceux-ci sont retrouvés chez les patients déficients pour SAP.

## **6. Fonctions non apoptotiques des IAP :**

Hormis leur rôle antiapoptotique, les IAP interviennent de manière prépondérante dans d'autres mécanismes physiologiques.

### **a) Signalisation :**

Le rôle des IAP dans la signalisation cellulaire a été proposé quand en 1995 il a été montré que cIAP1 et cIAP2 s'associent à la molécule TNFR2. Ces deux IAP se lient directement à TRAF1 et TRAF2, deux molécules impliquées dans la transduction des signaux médiés par le TNF. Cette interaction se fait via le BIR1 des cIAP. cIAP1 et cIAP2 peuvent ubiquitiner TRAF2 et TRAF1 respectivement et induire ainsi leur dégradation par le protéasome<sup>399,400</sup>.

XIAP est quant à elle impliquée dans plusieurs voies de transduction de signaux : la voie des c-Jun-N-terminal kinases (JNK)<sup>401,402</sup>, la voie du TGF- $\beta$ <sup>403</sup> et la voie du *Bone morphogenetic protein* (BMP)<sup>404</sup>. Cette action se fait par l'interaction du BIR1 de XIAP avec TAB1. D'ailleurs, la voie du TGF- $\beta$  régule également l'expression de la protéine XIAP<sup>405</sup>. Plus récemment, XIAP a aussi été impliquée dans le métabolisme intracellulaire du cuivre en interagissant avec COMMD1. XIAP se fixe sur COMMD1 via son BIR3 et peut entraîner sa dégradation<sup>406</sup>.

### **b) La voie NF- $\kappa$ B :**

cIAP1 et cIAP2 régulent toutes deux la voie canonique et la voie non canonique de NF- $\kappa$ B de manière opposée : elles régulent positivement la voie canonique<sup>407</sup> et sont nécessaires à la suppression de l'activation constitutive de la voie non canonique<sup>408,409</sup>. Même si son rôle est moins documenté que pour cIAP1 et cIAP2, XIAP joue également un rôle dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Ainsi, XIAP active la voie NF- $\kappa$ B en interagissant via son BIR1 avec TAB1<sup>410</sup> et en interagissant avec le régulateur négatif de la voie NF- $\kappa$ B, COMMD1<sup>411</sup>.

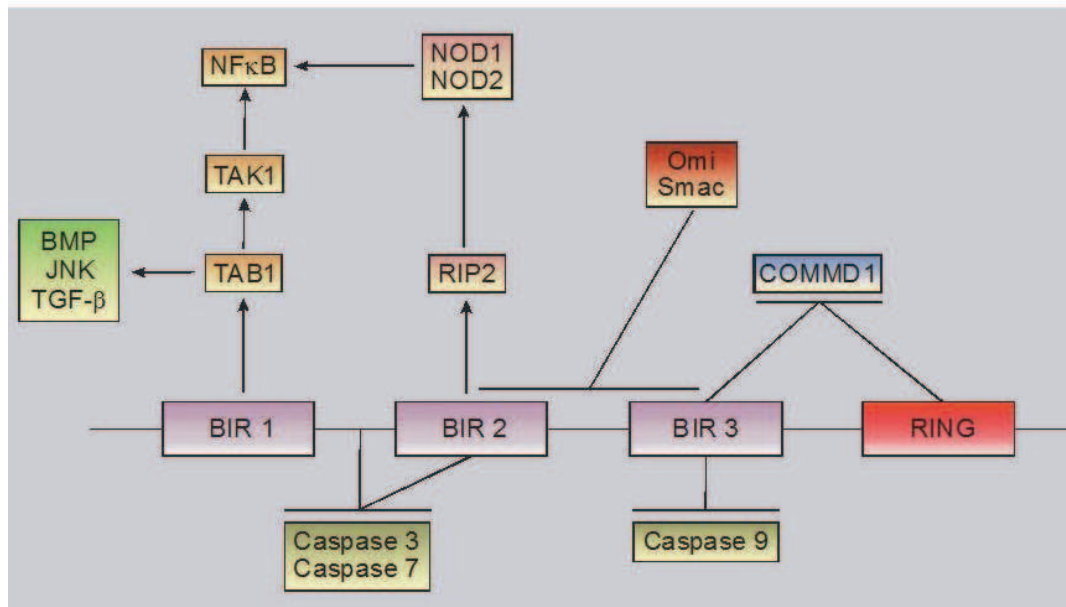
### c) Les IAP et l'immunité innée :

Les IAP interviennent enfin dans l'immunité innée, en interagissant avec des récepteurs de l'immunité innée ou des molécules impliquées dans la voie de signalisation de ces récepteurs. Il a été montré que les IAP interviennent dans la voie des récepteurs NOD1 et NOD2, qui sont des récepteurs intra-cytosoliques reconnaissant des fragments du peptidoglycane. Chez l'homme, XIAP interagit avec NOD1 et NOD2 via RIP2<sup>412</sup>; dans des lignées cellulaires monocytaires, la stimulation de la voie NOD2 aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires. Cette réponse est abolie lorsque XIAP est absente. De même, l'inhibition de l'expression de XIAP entraîne un défaut de réponse de la voie NOD1 dans les cellules épithéliales digestives. Cette interaction se fait via le BIR2 de XIAP. Récemment, XIAP a aussi été impliqué dans la voie de signalisation de NOD2 chez la souris<sup>413</sup>. Chez l'homme et la souris, cIAP1 et cIAP2 sont aussi impliquées dans la voie de signalisation de NOD1 et de NOD2. La souris déficiente en cIAP1 ou cIAP2 a en effet un défaut de réponse *in vitro* mais aussi *in vivo* au DAP et au MDP, le ligand de NOD1 et de NOD2 respectivement<sup>414</sup>.

Les cIAP pourraient également intervenir dans la voie de signalisation du TLR4 en favorisant la dégradation de TRAF3, permettant ainsi la translocation du complexe MyD88 dans le noyau, et la réponse inflammatoire<sup>415</sup>. Enfin les cIAP interagissent avec un autre type de récepteurs cytoplasmique de l'immunité innée, RIG1, qui reconnaît des ARN doubles brins par son domaine hélicase<sup>416</sup>. Ainsi, dans des cellules dendritiques humaines, l'absence des cIAPs altère la production d'IFN- $\beta$  en réponse à une infection par le virus de Sendai qui est reconnu par RIG-1<sup>417</sup>.

Les IAP et en particulier XIAP interviennent donc dans d'autres voies que l'apoptose. La figure 10 ci-dessous résume les principales interactions de XIAP.





**Figure 10 : Schéma représentant les interactions principales de XIAP.** La protéine XIAP intervient dans de nombreuses voies de signalisation par ses différents domaines.

## 7. La souris déficiente en XIAP :

### a) Génération :

La souris XIAP KO a été générée en 2001 par Harlin et al. par recombinaison homologue en remplaçant le premier exon de *XIAP* par un gène de résistance à la néomycine<sup>418</sup>. Le choix de l'exon 1 permet d'enlever les 2 premiers domaines BIR et la moitié du troisième. En utilisant un anticorps en C-terminal les auteurs ont montré que la souris n'exprime pas de protéine résiduelle. Une deuxième souris XIAP KO a été décrite en 2005. Elle a été obtenue en remplaçant les deux premiers exons de *XIAP* par un gène de résistance à la néomycine<sup>419</sup>. De la même manière que la première souris KO décrite, cette souris n'exprime pas de protéine résiduelle. Sur le plan cellulaire, il n'a pas été mis en évidence chez ces souris de défaut T ou B, ni de défaut de formation des centres germinatifs et elles ont un nombre de cellules iNKT normal<sup>346,420</sup>.

### b) Pas de phénotype apoptotique clair :

Les premières observations n'ont révélé aucune anomalie chez la souris XIAP KO. Une série de tests a alors été effectuée afin de mettre en évidence un défaut chez la souris KO : prolifération des cellules lymphoïdes, immunisation par le *keyhole limpet hemocyanin*, apoptose de thymocytes et splénocytes suite à une irradiation par des rayons UV et des rayons gamma, apoptose suite à la stimulation de Fas de thymocytes DP, apoptose des



thymocytes DP suite à injection d'anti-CD3, activation des voies JNK dans des thymocytes ou des MEF (*mouse embryonic fibroblasts*). Dans toutes les expériences, les souris XIAP KO ont répondu de la même manière que les souris sauvages<sup>418</sup>. Le seul phénotype rapporté par les auteurs de cette étude est une expression plus forte de cIAP1 et cIAP2 dans des fibroblastes embryonnaires suggérant ainsi un mécanisme de compensation de l'absence de XIAP par ces deux autres IAP. Néanmoins, une étude ultérieure n'a pas reproduit ces résultats<sup>421</sup>.

Malgré ces premiers résultats neutres, des études ultérieures ont pu mettre en évidence des différences de comportement de certains types cellulaires dans des conditions bien particulières. Par exemple, la micro-injection cytosolique de cytochrome c dans des neurones sympathiques provoque leur mort en l'absence de XIAP uniquement<sup>422</sup>. Le même type de résultat a aussi été trouvé sur des cardiomyocytes<sup>423</sup>. L'équipe de Olayioye a montré en 2004 un retard de développement alvéolaire des glandes mammaires en fin de gestation ainsi qu'une diminution de la production de lait en tout début de lactation<sup>419</sup>. En 2008, l'équipe de Duckett rapportait également une augmentation de l'apoptose médiée par le TNF et par la voie mitochondriale dans des fibroblastes pulmonaires<sup>424</sup>.

### **c) Des défauts de réponses aux infections :**

Lors de leur génération, les souris ont été infectées par *Leishmania major* et ont répondu de la même manière que les souris sauvages. Il a cependant été montré en 2008 que l'absence de XIAP entraîne une mauvaise réponse à l'infection par *Listeria monocytogenes*. Le titre bactérien à 48h post infection est supérieur et la survie des souris KO est diminuée. XIAP joue alors un rôle d'activation de la voie NF- $\kappa$ B dans les macrophages infectés et prolonge la voie de signalisation des JNK en réponse aux bactéries cytosoliques. De plus, XIAP permet l'induction efficace de cytokines pro-inflammatoires suite à l'infection par *Listeria monocytogenes in vitro* et *in vivo*<sup>425</sup>. Enfin, des fibroblastes embryonnaires issus de souris XIAP KO infectés par le virus MHV-68 meurent 72 h après l'infection alors que les cellules de souris sauvages survivent. Par ailleurs, la résistance des cellules KO à l'infection est restaurée en complémentant avec une copie fonctionnelle du gène *XIAP*. Cette restauration n'a plus lieu si on utilise une forme mutée qui empêche la liaison aux caspases<sup>420,426</sup>. La mort des cellules XIAP KO est donc due à un phénomène apoptotique.

La souris XIAP KO, présente donc des défauts de réponse des récepteurs de l'immunité innée. Son phénotype apoptotique est lui beaucoup moins clair puisqu'il n'est

révélé que dans des conditions bien particulières. Il semblerait donc que le rôle de XIAP dans l'apoptose ou la régulation de l'apoptose soient différents chez l'homme et la souris posant alors la question de la validité du modèle de souris XIAP KO pour l'étude du XLP-2.

### **Projet de thèse :**

L'unité 768 de l'INSERM étudie les déficits immunitaires primitifs de l'enfant. Notre équipe s'intéresse plus particulièrement à l'étude du syndrome de Purtilo, ou syndrome lymphoprolifératif lié à l'X. Nous avons mis en évidence en 2006 des mutations dans le gène *XIAP* responsables du XLP-2<sup>346</sup>. Nos connaissances actuelles indiquent que l'absence de SAP et de XIAP conduit à des défauts fonctionnels et cellulaires bien distincts, à l'exception du déficit en lymphocytes iNKT qui, pour le moment, représente le seul défaut commun aux patients déficients pour SAP et pour XIAP

Si plusieurs études ont montré que SAP est nécessaire au développement des cellules iNKT lors de leur sélection positive dans le thymus, le rôle exact de XIAP dans le développement et l'homéostasie des cellules iNKT reste à être déterminé. Mon travail de thèse, dans une première partie, a consisté à comprendre le rôle de XIAP dans le développement et l'homéostasie des cellules iNKT.

De plus, si les défauts moléculaires à l'origine du syndrome de Purtilo commencent à être connus, la physiopathologie de ce syndrome, et plus particulièrement la réponse immunitaire anormale contre l'EBV, est toujours mal comprise. Or, deux virus de la famille des  $\gamma$ -herpesvirus, HSV-1 et HHV-8 ont la propriété d'interférer avec l'expression de CD1d à la surface des cellules<sup>214,215</sup>, et la vaccination contre un autre virus de cette famille, le VZV a déclenché une varicelle sévère chez deux patients qui ne présentent pas d'autres anomalies qu'un nombre réduit de cellules iNKT<sup>204,205</sup>. Comme l'EBV est aussi un virus de la famille des  $\gamma$ -herpesvirus, le défaut commun en lymphocytes iNKT chez les patients XLP suggère un rôle important de ces cellules dans la réponse contre l'EBV. Un deuxième aspect de mon travail de thèse a alors été de comprendre si les cellules iNKT pouvaient avoir un rôle dans le contrôle de l'infection par l'EBV.

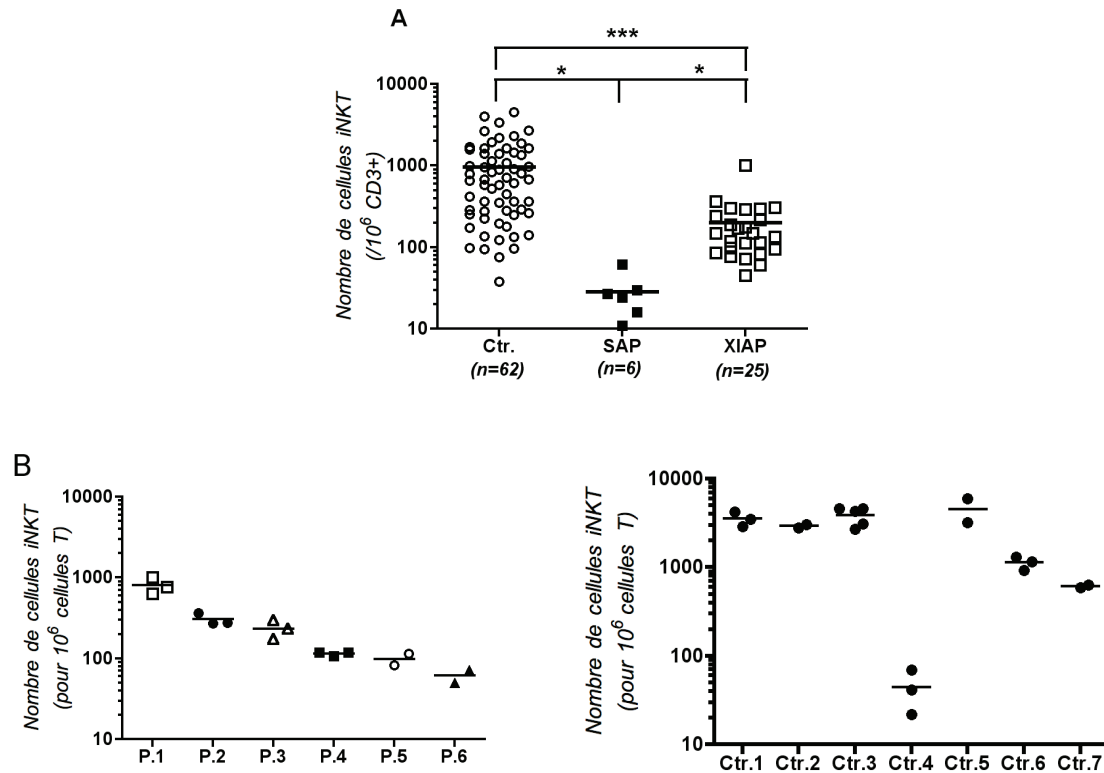
## **II. RESULTATS :**

### **A. MISE EN ÉVIDENCE DU CARACTÈRE PRO-APOPTOTIQUE DES CELLULES iNKT CHEZ L'HOMME, RÔLE DE XIAP ET RÔLE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION PLZF :**

#### **1. Réduction du nombre de cellules iNKT chez les patients XLP :**

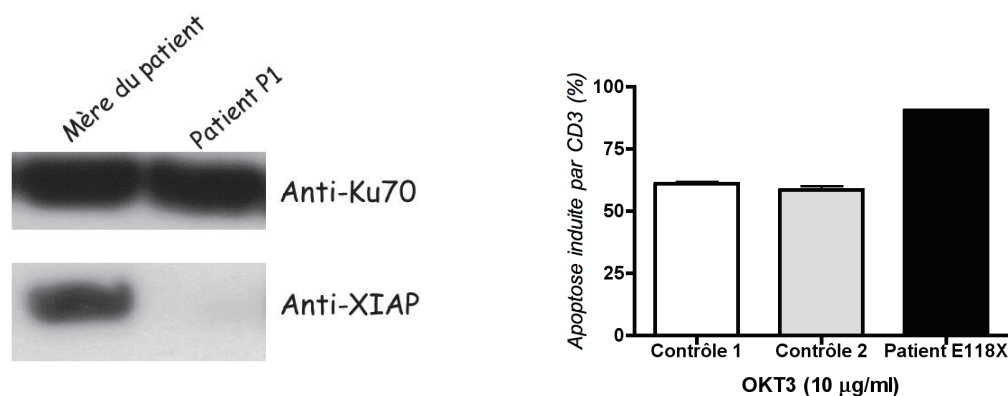
Notre équipe a déjà décrit en 2006 une cohorte de patients XLP-2, et constaté que comme les patients XLP-1, les patients déficients en XIAP présentent une réduction de leur nombre de lymphocytes iNKT en périphérie<sup>346</sup>. Nous avons complété ces résultats en analysant les cellules iNKT chez de nouveaux témoins et de nouveaux patients XLP-1 et XLP-2 (on pourra se référer à l'article de Pachlophnik et al. pour une description de la plupart des patients étudiés<sup>347</sup>). Les cellules iNKT sont détectées dans le sang en marquant les cellules du sang périphérique (PBMC) par la combinaison d'anticorps anti-CD3, anti-V $\alpha$ 24 et anti-V $\beta$ 11. Dans la mesure du possible, au moins 1 000 000 d'événements CD3<sup>+</sup> sont acquis par cytométrie. Les résultats sont exprimés en nombre de lymphocytes iNKT pour 1 000 000 de cellules T CD3<sup>+</sup>.

Chez les contrôles, la fréquence des cellules iNKT en périphérie est très variable allant de 50 à 10000 cellules iNKT pour 1 000 000 de cellules T CD3<sup>+</sup>. Les patients XLP-1 et XLP-2 ont un nombre de cellules iNKT significativement réduit par rapport aux témoins (figure 11, A). Comme déjà décrit dans la littérature, les patients XLP-1 n'ont quasiment pas de cellules iNKT en périphérie<sup>94,330</sup>. Cette réduction est significativement moins prononcée chez les patients XLP-2. Chez 5 patients XLP-2 et 7 témoins, le nombre de cellules iNKT a été mesuré à plusieurs reprises et reste stable au cours du temps (figure 11, B). Les contrôles, à l'exception du premier qui est séronégatif, ont une immunité ancienne anti-EBV, comme en témoigne la détection d'anticorps IgG anti-EBNA et anti-VCA par ELISA (données non représentées). Tous les patients testés à l'exception du patient P.1 avaient également déjà été infectés par l'EBV avant leur exploration.



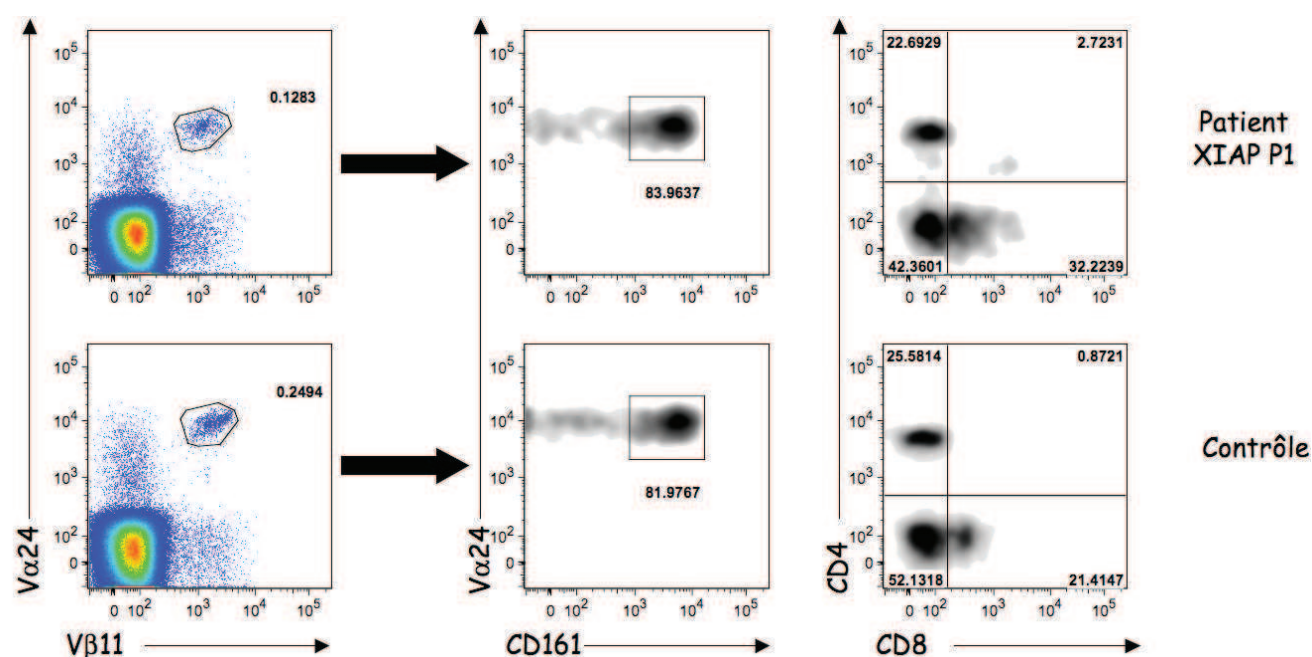
**Figure 11 : Les patients déficients en SAP et XIAP ont une réduction du nombre de leurs cellules iNKT en périphérie.** (A) Comparaison du nombre de cellules iNKT (TCRV $\alpha$ 24<sup>+</sup>TCRV $\beta$ 11<sup>+</sup>) dans les lymphocytes CD3<sup>+</sup> du sang de donneurs sains (Ctr), de patients déficients en SAP (SAP) et de patients déficients en XIAP (XIAP) (\* P<0,05\*\*\* P<0,001) : (B) Le nombre de cellules iNKT est constant au cours du temps. 6 patients et 7 contrôles ont été testés plusieurs fois à des intervalles de temps allant de 6 à 12 mois.

De manière intéressante, le patient P1 qui n'a pas encore été infecté par l'EBV (charge virale négative par PCR et absence d'anticorps anti-EBV par ELISA, données non représentées) a un nombre de cellules iNKT qui est dans la moyenne des donneurs sains (B). Ce patient porte la mutation XIAP<sup>E118X</sup> qui est une mutation nulle sans expression détectable de XIAP (figure 12, panel de gauche). Ce patient, s'il n'a toujours pas déclaré la maladie à l'âge de 9 ans, présente une splénomégalie qui est l'un des premiers signes cliniques évocateurs d'un XLP-2<sup>347</sup>. Par ailleurs, ses cellules en culture ont un excès d'apoptose induite par un anti-CD3, comme le montre la figure 12.



**Figure 12 : Le patient P1 a un excès d'apoptose.** (Panel de gauche) Le patient P1 porte la mutation E118X. Des blastes du patient et de sa mère ont été lysés. L'expression de XIAP a été mesurée par western blot. Le contrôle de charge est effectué à l'aide d'un anti-Ku70. (Panel de droite) Des blastes PHA du patient et de deux contrôles ont été stimulés avec un anti-CD3 pendant 36h. L'apoptose induite des cellules a ensuite été mesurée. Les barres d'erreurs représentent des duplicats d'expérience.

Nous avons analysé les cellules iNKT du patient P1. Comme le montre la figure 13, ses cellules iNKT semblent avoir un développement normal comme l'indique la proportion de cellules CD161<sup>+</sup> et la répartition CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>.



**Figure 13 : Le développement des cellules iNKT humaines n'est pas affecté par l'absence de XIAP.** Les cellules iNKT du patient XLP-2 P1 (ligne du haut) et d'un contrôle (ligne du bas) ont été analysées. Le panel de gauche représente les cellules CD3<sup>+</sup> sur lesquelles on sélectionne les cellules iNKT par le marquage Vα24<sup>+</sup>Vβ11<sup>+</sup>. Les marqueurs CD161, CD4 et CD8 ont ensuite été étudiés sur les cellules iNKT.

Ces résultats suggèrent donc que XIAP ne semble pas requis chez l'homme pour le développement des cellules iNKT. En revanche, la fonction anti-apoptotique majeure de XIAP nous a conduits à envisager le rôle de l'excès d'apoptose observé chez ces patients dans

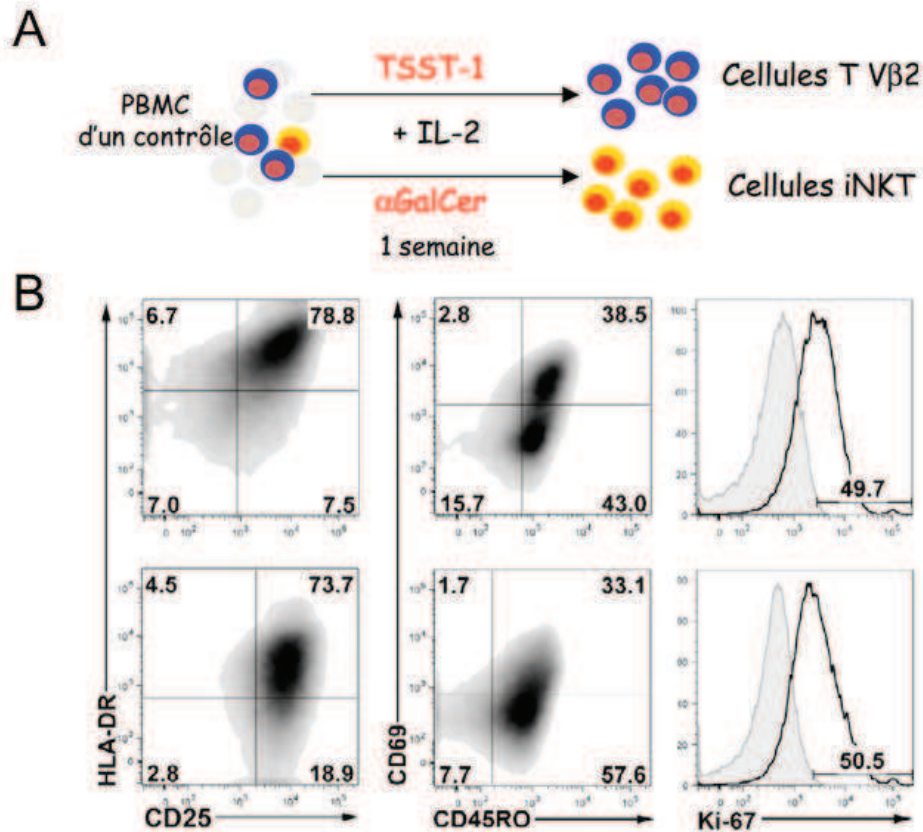
la constitution de la lymphopénie iNKT. Comme il n'existe par ailleurs pas de diminution du nombre des cellules T conventionnelles, nous avons fait l'hypothèse que les cellules iNKT seraient plus sensibles à l'apoptose. Les cellules iNKT seraient ainsi plus dépendantes de XIAP pour leur survie en périphérie. Un argument en faveur de cette hypothèse est la constatation d'un nombre significativement plus élevé de cellules iNKT chez des patients porteurs de mutations hypomorphes par rapport aux patients porteurs de mutations nulles de *XIAP* (annexe 1, figure 37). Ces mutations hypomorphes laissent toutes intactes au moins une des régions de XIAP nécessaires à son activité anti-apoptotique *in vivo* (région linker, BIR2 et domaine RING, cf. tableau 4 et figure 39 de l'annexe 1). Ces observations suggèrent que les patients hypomorphes ont un nombre plus élevé de cellules iNKT grâce à une activité anti-apoptotique résiduelle de XIAP *in vivo*.

## **2. Mise en évidence du caractère apoptotique des cellules iNKT :**

Pour tester l'hypothèse d'une plus grande susceptibilité à l'apoptose des cellules iNKT, nous avons comparé l'apoptose de cellules T conventionnelles avec celle des cellules iNKT en réponse à des stimuli activant la voie extrinsèque ou intrinsèque de l'apoptose. Compte tenu du faible nombre de cellules iNKT que l'on retrouve en périphérie, ces expériences ont été réalisées dans un premier temps avec des cultures de cellules iNKT : des PBMC sont cultivées en présence d' $\alpha$ GalCer et d'IL-2 (1000 U/ml). Au bout d'une semaine, les cellules iNKT ont subi une expansion importante et représentent de 1,5 à 60 % des cellules en culture selon les donneurs. Pour obtenir une population de cellules T conventionnelles dans des conditions comparables, nous avons choisi de mettre en expansion les cellules T ayant un réarrangement V $\beta$ 2. Cette population représente en effet une population majeure circulante chez l'homme et prolifère lorsqu'elle est stimulée par le superantigène *Toxic Shock Syndrome Toxine 1* (TSST-1) produit par *Staphylococcus aureus*<sup>427</sup>. Après une semaine, les cellules V $\beta$ 2 représentent de 10 à 70% des cellules en culture (figure 14, A). Pour un même donneur, nous avons obtenu des cultures de lymphocytes iNKT et de lymphocytes T V $\beta$ 2. Après expansion, l'expression de marqueurs d'activation CD45RO, CD25, CD69, HLA-DR et KI-67 a été analysée dans les cultures. Le marquage KI-67 est positif dans les deux types d'expansion montrant que les cellules sont en prolifération et ce avec la même intensité. Les autres marqueurs sont similaires pour les deux types d'expansion à l'exception de HLA-DR qui est exprimé plus fortement par les cellules iNKT (figure 14, B). Dans les deux types



d'expansions, les cellules ont donc un phénotype activé/mémoire, ce qui est cohérent après une semaine d'expansion.



**Figure 14 : Phénotype des cellules iNKT et Vβ2 obtenues après expansions *in vitro*.** (A) Des PBMC d'un même contrôleur sont mises en culture en RPMI + 10% de SVF en présence d'IL-2 à 1000 U/ml et en présence d'αGalCer à 100 ng/ml ou de TSST-1 à 500ng/ml pendant une semaine. (B) Expression de marqueurs d'activation des cellules en expansion.

Pour mesurer l'apoptose des cellules iNKT, nous avons utilisé une approche cellulaire en utilisant un marquage des cellules avec de l'annexineV en combinaison avec du 7-Aminoactinomycine D (7-AAD). On trouvera en annexe 2 une description de la méthodologie employée ainsi que des exemples de figures de FACS obtenues.

### 3. Les cellules iNKT ayant subi une expansion *in vitro* sont plus sensibles à l'apoptose que des cellules T conventionnelles ayant subi une expansion :

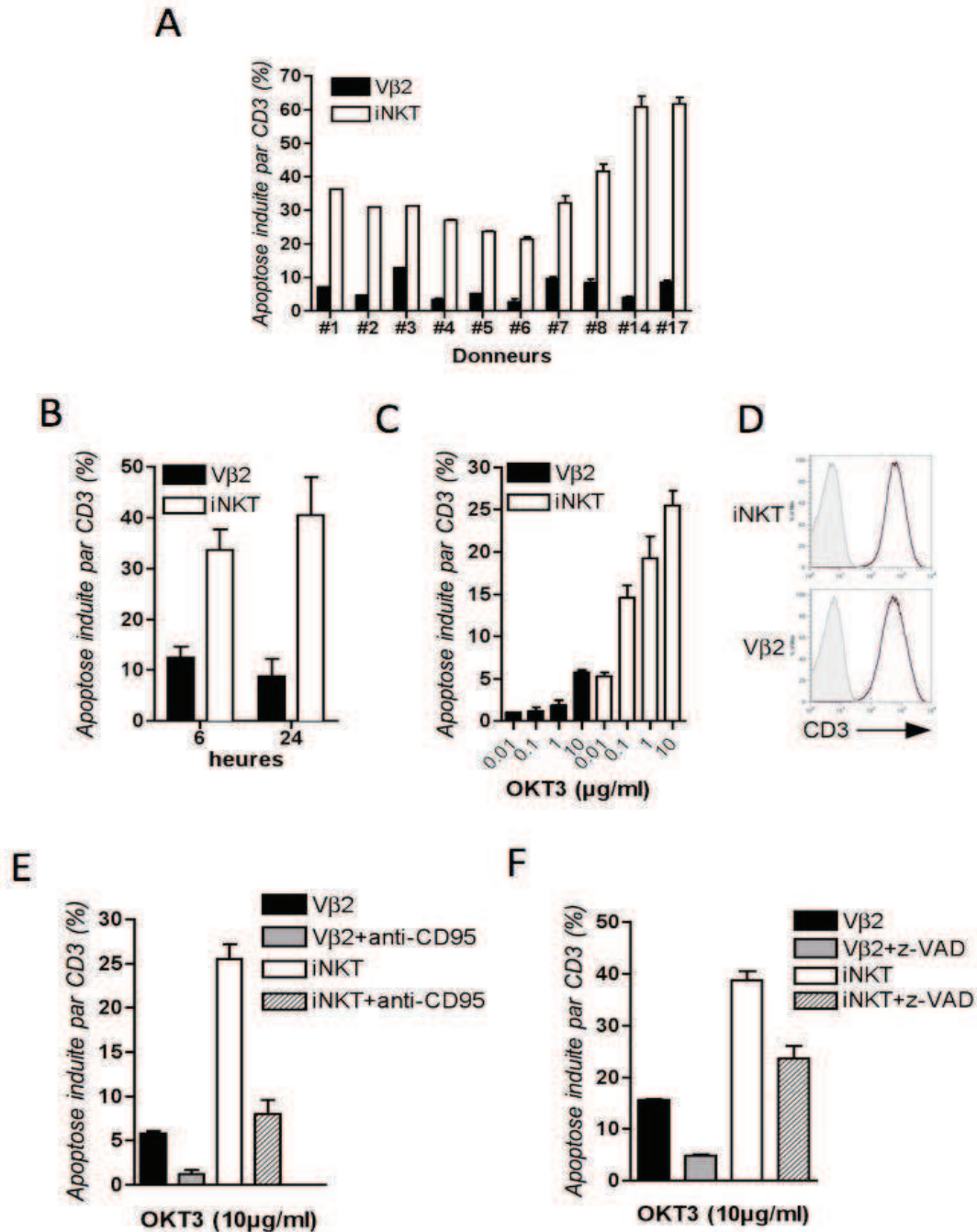
Dans la suite, on utilisera de manière répétée les mêmes contrôles dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau 5 que l'on trouvera en annexe 3. Un donneur faisant partie de ce tableau sera identifié dans les figures par le symbole # suivi du numéro correspondant. Ces contrôles présentent des nombres variables de lymphocytes iNKT et T



V $\beta$ 2 dans le sang p r ph rique et constituent donc un échantillon représentatif de la population.

**a) Les cellules iNKT sont plus sensibles à l'AICD que les cellules T V $\beta$ 2 conventionnelles :**

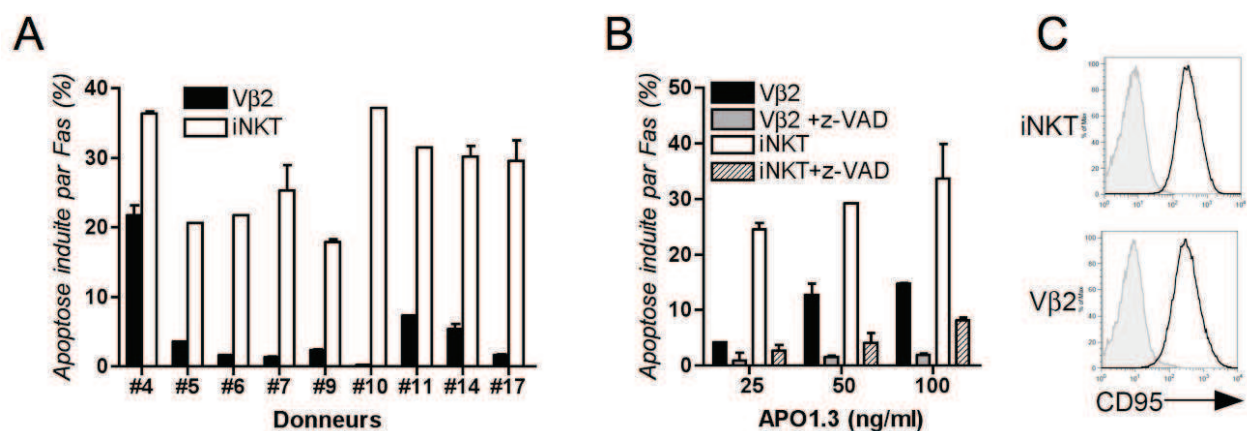
Dans une première série d'expériences, nous avons analysé l'AICD dans les deux types expansions en stimulant les cellules par un anticorps anti-CD3 fixé au plastique pendant 18h. Pour les différents donneurs sains testés, l'AICD des cellules iNKT est nettement plus élevée que celle des cellules T V $\beta$ 2 conventionnelles correspondantes (figure 15, A). Par ailleurs, l'apoptose des cellules iNKT est supérieure à celle des cellules V $\beta$ 2 dès 6h de stimulation (panel B). Ce phénomène accru d'apoptose ne dépend pas de la dose d'anti-CD3 utilisée comme le montre l'utilisation d'une gamme de concentrations d'anti-CD3 (panel C). De plus, l'excès d'AICD des cellules iNKT par rapport aux cellules conventionnelles T V $\beta$ 2 ne peut pas être expliqué par une expression plus importante de CD3 sur les cellules iNKT comme le montre le panel D. Enfin, l'AICD qui dépend de l'interaction Fas/FasL et des caspases peut être inhibée dans les deux types d'expansion par ajout dans la culture d'un anticorps anti-Fas bloquant (panel E) et partiellement inhibée par ajout d'un inhibiteur des caspases, le z-VAD (panel F).



**Figure 15 : L'AICD des cellules iNKT est supérieure à celle des cellules T Vβ2 conventionnelles.** (A) L'apoptose de cellules iNKT et Vβ2 d'expansions de dix contrôles différents stimulées par un anti-CD3 (10 μg/ml) a été mesurée. Les barres d'erreurs correspondent à des duplicats d'expériences. (B) L'apoptose a été mesurée 6h et 24h après stimulation. Les données représentent la moyenne de 4 expériences avec 4 contrôles différents (#1, 3, 6 et 19). (C) Les cellules d'expansions d'un contrôle (#6) ont été stimulées par des doses croissantes d'anti-CD3. Les barres d'erreurs correspondent à des duplicats d'expériences. (D) L'expression de CD3 a été mesurée sur les deux types d'expansions d'un donneur. L'histogramme gris correspond à l'isotype et l'histogramme noir à l'anti-CD3. Les données correspondent à une expérience représentative de 10. (E) Les cellules d'expansions d'un contrôle (#6) ont été stimulées par un anti-CD3 en présence d'un anti-Fas bloquant. Les barres d'erreurs correspondent à des duplicats d'expériences. (F) Les cellules d'expansions d'un contrôle (#6) ont été stimulées par un anti-CD3 en présence de l'inhibiteur de caspases z-VAD. Les barres d'erreurs correspondent à des duplicats d'expérience.

**b) Les cellules iNKT sont plus sensibles que les cellules T V $\beta$ 2 conventionnelles à une stimulation par Fas :**

Pour confirmer ces résultats, nous avons stimulé directement les cellules via Fas avec un anticorps anti-CD95 (clone Apo1.3). De la même manière que pour l'AICD, les cellules iNKT sont plus sensibles à l'apoptose médiée par Fas, et ce, quelle que soit la dose d'anti-CD95 utilisée. De plus, l'apoptose est inhibée en présence de z-VAD (figure 16, A et B). Enfin, la différence d'apoptose ne peut pas être expliquée par une différence d'expression de CD95 entre les deux populations puisque celle-ci est similaire pour les deux types cellulaires (figure 16, C).

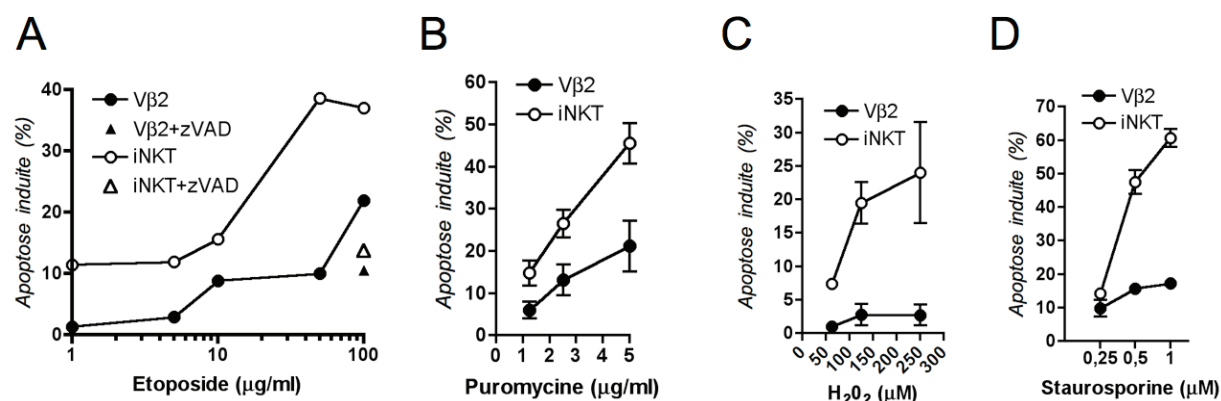


**Figure 16 : L'apoptose médiée par Fas est supérieure dans les cellules iNKT.** (A) L'apoptose de cellules iNKT et V $\beta$ 2 d'expansions de neuf contrôles différents stimulées par un anti-Fas soluble (100 ng/ml) a été mesurée. Les barres d'erreurs correspondent à des duplicats d'expériences. (B) Les cellules d'expansions de quatre contrôles (#3, 4, 6 et 20) ont été stimulées par des doses croissantes d'anti-Fas soluble en présence ou non de l'inhibiteur de caspases z-VAD. (C) L'expression de CD95 a été mesurée sur les deux expansions. L'histogramme grisé correspond à l'isotype et l'histogramme noir à l'anti-CD95. Les données correspondent à une expérience représentative de 7.

**c) Les cellules iNKT sont plus sensibles que les cellules T V $\beta$ 2 conventionnelles à l'apoptose intrinsèque :**

La voie intrinsèque de l'apoptose a ensuite été testée en utilisant des drogues comme l'étoposide, la puromycine, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et la staurosporine. L'étoposide inhibe la synthèse d'ADN et entraîne l'accumulation de cassures de l'ADN provoquant ainsi l'apoptose de la cellule. La puromycine est un antibiotique qui inhibe la synthèse protéique en interférant avec les ribosomes. L'eau oxygénée provoque l'apparition de dérivés réactifs de l'oxygène au sein de la cellule qui vont entraîner l'entrée en apoptose des cellules par accumulation de dommages à l'ADN. La staurosporine est un antibiotique produit par *Streptomyces staurosporeus*. L'action principale de cette drogue est l'inhibition des kinases en empêchant la fixation de

l'ATP à celles-ci. Si le mécanisme exact d'induction d'apoptose par cette drogue n'est pas connu, il semble faire intervenir la caspase 3<sup>428</sup>. Avec toutes les drogues testées, l'apoptose des cellules iNKT est supérieure à celle des cellules V $\beta$ 2 (figure 17). De plus, pour l'étoposide, l'apoptose dépend bien des caspases puisqu'elle est bloquée par l'ajout de z-VAD dans la culture (panel A).



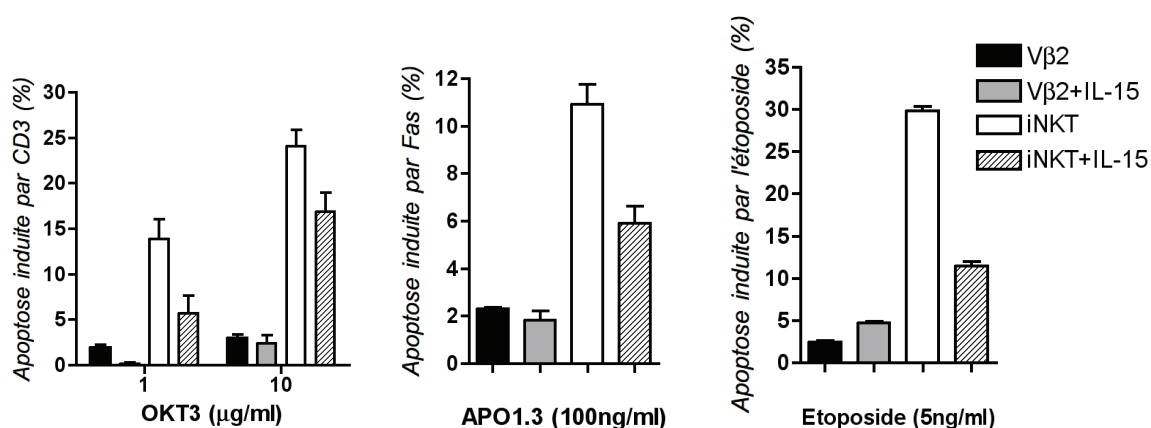
**Figure 17 : L'apoptose via la voie intrinsèque est également augmentée dans les cellules iNKT.** (A) Les expansions iNKT et V $\beta$ 2 d'un contrôle (#4) ont été mises en présence de doses croissantes d'étoposide. À la plus forte dose, les cellules ont aussi été mises en présence de z-VAD. (B) Stimulation avec des doses croissantes de puromycine. Les données représentent trois expériences avec trois contrôles différents (#5, 6 et 9) en duplicat. (C) Stimulation avec des doses croissantes d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les données représentent deux expériences avec deux contrôles différents (#6 et 9) en duplicat. (D) Stimulation avec des doses croissantes de staurosporine. Les données représentent deux expériences avec deux contrôles différents (#7 et 9) en duplicat.

Pour nous assurer que la plus forte apoptose des cellules iNKT par rapport aux cellules V $\beta$ 2 n'est pas uniquement due au système d'expansion par la TSST-1, nous avons analysé l'apoptose dans deux autres systèmes. Nous avons ainsi comparé une expansion de cellules iNKT à une expansion de cellules T CD8<sup>+</sup> dirigées contre le CMV (annexe 4, figure 42, A). Un deuxième système utilisé a été celui d'une expansion par la Phytohéماغglutinine (PHA) (annexe 4, figure 42, B et C). De la même manière que pour les expansions T V $\beta$ 2, l'apoptose des cellules iNKT est supérieure à celle des cellules T CD8<sup>+</sup> anti-CMV ou celle de blastes PHA que ce soit par une stimulation par CD3 ou Fas.

L'ensemble de nos résultats montrent donc qu'après expansion, les cellules iNKT ont un phénotype pro-apoptotique en comparaison avec des cellules T conventionnelles comme des cellules T V $\beta$ 2, des cellules T CD8<sup>+</sup> anti-CMV ou des blastes PHA.

#### d) L'IL-15 atténue en partie l'apoptose élevée des cellules iNKT :

Nous avons essayé de voir s'il est possible d'atténuer la susceptibilité à l'apoptose des cellules iNKT. L'IL-15 est une cytokine impliquée dans la survie de ces cellules en périphérie<sup>113</sup>. L'ajout d'IL-15 au cours des expansions permet de diminuer l'apoptose des cellules iNKT quel que soit le stimulus apoptotique utilisé.

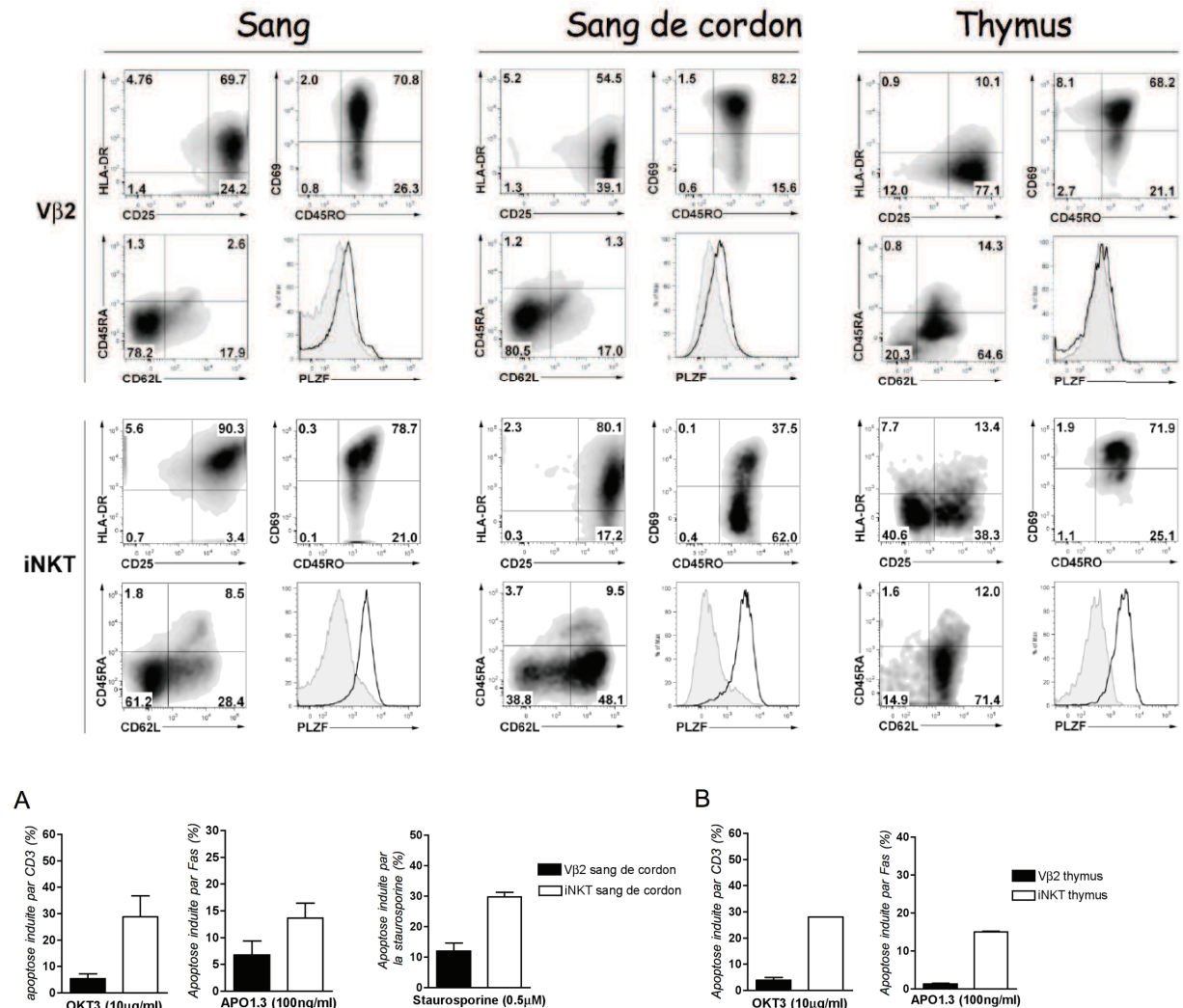


**Figure 18 : L'IL-15 permet de réduire partiellement le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT.** Des cellules d'un contrôle (#4) ont été mises en expansion en présence ou non d'IL-15 (50 ng/ml). L'apoptose des cellules stimulées par un anti-CD3 (panel de gauche), un anti-Fas (panel du milieu) ou par de l'étoposide (panel de droite) a été évaluée. Les expériences ont été faites en duplicat.

#### e) Le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT est conservé si les cellules proviennent de sang de cordon ou du thymus :

Nous avons ensuite comparé l'apoptose de cellules iNKT et Vβ2 obtenues après expansions à partir de sang périphérique d'adultes, de sang de cordon et de thymus. Comme attendu, les cellules obtenues après expansions à partir de sang de cordon et de thymus ont un phénotype mémoire/activé moins prononcé que les cellules obtenues à partir de sang périphérique. En effet, les marqueurs CD69 et HLA-DR sont moins exprimés et le marqueur CD62L est lui plus fortement exprimé dans les expansions obtenues à partir de sang de cordon ou de thymus. Le facteur de transcription PLZF, qui joue un rôle clé dans le développement des cellules iNKT<sup>105,106</sup> n'est quasiment pas exprimé par les cellules Vβ2 alors qu'il l'est dans les cellules iNKT et ce de la même manière quelle que soit l'origine des cellules mises en expansion (figure 19, panel du haut). Comme les cellules du sang périphérique, les cellules iNKT obtenues à partir d'expansions de sang de cordon ou du thymus présentent une apoptose plus importante que les cellules Vβ2 correspondantes en réponse à la stimulation par Fas, CD3 ou la staurosporine (figure 19, panel du bas, A et B). Le

phénotype pro-apoptotique des expansions de cellules iNKT à partir de sang périphérique n'est donc pas dû à une stimulation préalable des cellules iNKT en périphérie. Les cellules iNKT ont ainsi un phénotype pro-apoptotique intrinsèque, déjà présent dans le thymus.

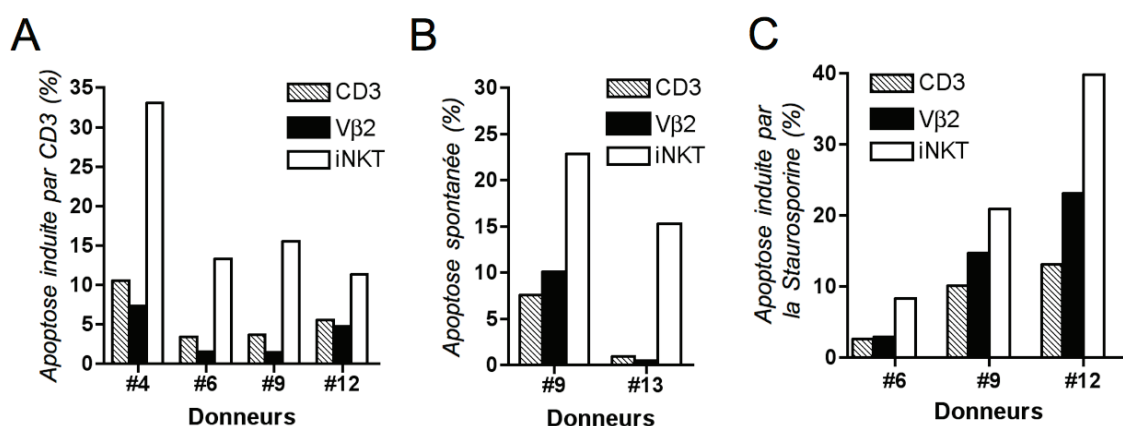
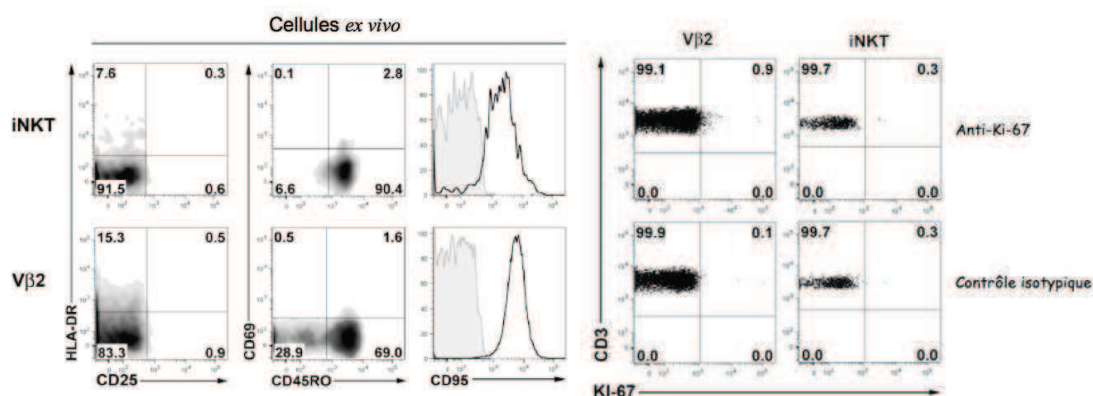


**Figure 19 : Le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT est déjà présent dans le thymus.** Panel du haut : l'expression de HLA-DR, CD25, CD69, CD45-RO, CD45-RA, CD62L et de PLZF sur des cellules iNKT et Vβ2 d'expansions à partir de sang périphérique, de sang de cordon et de thymus a été mesurée. Une expérience représentative de cinq pour le sang périphérique, de trois pour le sang de cordon et d'une pour le thymus. Pour PLZF, l'histogramme grisé correspond à l'isotype et l'histogramme noir à l'anti-PLZF. Panel du bas : (A) Les cellules d'expansions de sang de cordon ont été stimulées par un anti-CD3, un anti-Fas ou par de la staurosporine. Les barres d'erreurs correspondent à deux expériences avec deux sangs de cordon différents en duplicat. (B) Les cellules d'expansions de thymus ont été stimulées par un anti-CD3 ou un anti-Fas. Les barres d'erreurs correspondent à une expérience avec un thymus en duplicat.



#### **4. Les cellules iNKT *ex vivo* sont aussi plus sensibles à l'apoptose que les cellules V $\beta$ 2 :**

Pour nous assurer que l'excès d'apoptose des cellules iNKT n'est pas uniquement dû aux conditions d'expansions *in vitro*, nous avons comparé l'apoptose de cellules *ex vivo* chez quatre donneurs. L'analyse des marqueurs d'activation CD45RO, HLA-DR, CD25, CD69 et CD95 montre que les cellules iNKT et la majorité des cellules V $\beta$ 2 ne sont pas activées et ont un phénotype mémoire. De plus les cellules iNKT sont négatives pour le marqueur KI-67 alors qu'environ 2% des cellules V $\beta$ 2 sont positives. Cela indique que les cellules iNKT *in vivo* ne sont pas en cycle (figure 20, panel du haut). L'apoptose induite par une stimulation de CD3 est plus importante pour les cellules iNKT que pour les cellules V $\beta$ 2 ou pour les cellules CD3<sup>+</sup> dans leur ensemble. Comme on pouvait s'y attendre, les niveaux d'apoptose de cellules fraîchement isolées sont moins forts qu'avec les cellules mises en expansion pendant une semaine. Nous avons aussi mesuré l'apoptose spontanée en laissant les cellules en culture sans stimulation. De la même manière, l'apoptose des cellules iNKT est supérieure à celle des cellules T conventionnelles. Enfin, l'apoptose induite par la staurosporine est aussi supérieure dans les cellules iNKT fraîchement isolées (figure 20, A, B et C).



**Figure 20 : *Ex vivo*, les cellules iNKT sont également plus sensibles à l'apoptose que les cellules T Vβ2 conventionnelles.** (Panel du haut) L'expression de HLA-DR, CD25, CD69, CD45RO, CD95 et KI-67 a été analysée sur des cellules iNKT et Vβ2 *ex vivo*. Pour CD95, l'histogramme gris correspond à l'isotype et l'histogramme noir à l'anti-CD95. (Panel du bas) (A) Des PBMC *ex vivo* ont été stimulées par un anti-CD3 (10 µg/ml) pendant 8h, (B) laissées non stimulées pendant 72h, ou (C) stimulées par de la staurosporine (0,5 µg/ml) pendant 8h. L'apoptose des cellules CD3, Vβ2 ou iNKT a été mesurée.

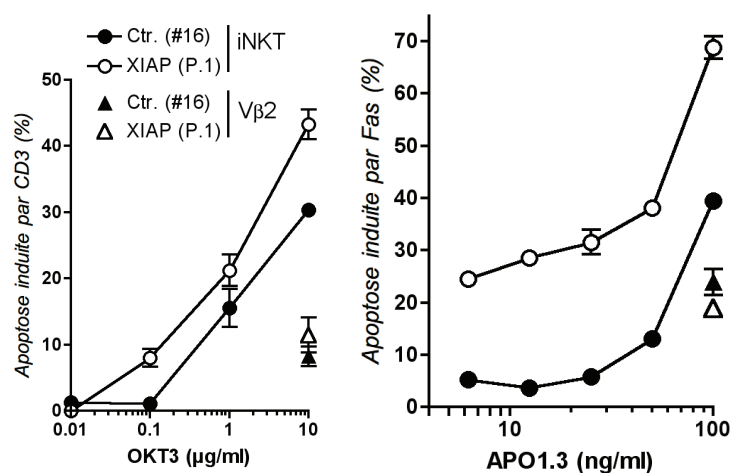
Les résultats de nos expériences *in vitro* et *ex vivo* montrent donc que les cellules iNKT sont plus sensibles à l'apoptose que des cellules T conventionnelles et présentent donc un phénotype pro-apoptotique.

## 5. XIAP régule le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT :

Nous avons ensuite cherché à savoir si XIAP joue un rôle dans l'apoptose des cellules iNKT. À cet effet, nous avons utilisé les cellules du patient XLP-2 P1. Ses cellules prolifèrent d'ailleurs normalement suite à la culture en présence d'αGalCer, ce qui suggère que l'absence de XIAP n'affecte pas les signaux du TCR conduisant à la prolifération des cellules iNKT. Après expansion, les cellules iNKT et Vβ2 ont été soumises à une stimulation par CD3 ou par Fas. Les cellules iNKT du patient montrent une apoptose supérieure à celle d'un témoin dont les cellules ont été mises en expansion en parallèle. Par contre, les cellules



V $\beta$ 2 du patient n'ont pas d'apoptose clairement supérieure à celle du témoin (figure 21). L'absence de XIAP semble donc entraîner un excès d'apoptose dans les cellules iNKT et dans une moindre mesure dans les cellules V $\beta$ 2.

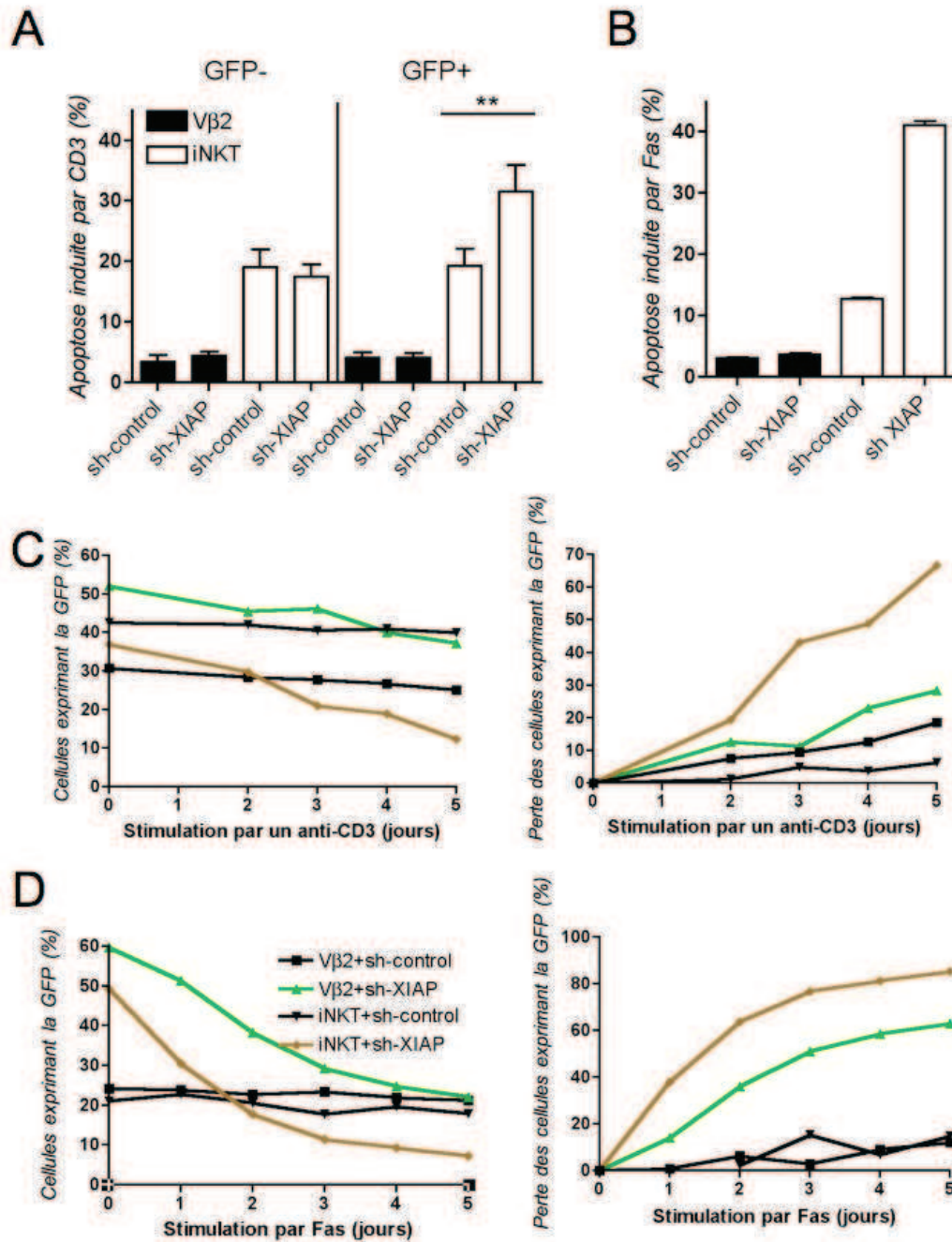


**Figure 21 : Une déficience en XIAP aggrave le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT.** Apoptose d'expansions de cellules iNKT et V $\beta$ 2 d'un patient déficient en XIAP et d'un contrôle, stimulées par un anti-CD3 (panel de gauche) ou un anti-Fas (panel de droite). Les données sont représentatives de deux expériences faites en duplicat.

Pour confirmer ces résultats, nous avons entrepris des expériences d'extinction de XIAP dans des cellules de témoin. Nous avons d'abord utilisé une approche chimique en utilisant le chélateur de zinc TPEN, décrit comme inhibant spécifiquement XIAP<sup>429</sup>. Il s'est avéré que cette approche n'était pas spécifique car nous avons observé que le TPEN inhibe aussi l'expression d'IAP-2. L'extinction spécifique de XIAP a été alors obtenue à l'aide de sh-RNA contenus dans un vecteur d'expression lentiviral. Nous avons testé cinq clones sur des cellules 293T. Une étude par western blot a montré que le clone 2 est le plus efficace (figure 22, panel A). Les clones étant initialement sélectionnables par de la puromycine, le gène de résistance à la puromycine a été remplacé par le gène rapporteur codant la GFP (*Fluorescent Protein*). Cette approche permet, au sein de la même culture, d'examiner les cellules ayant reçu le sh-RNA (qui sont donc GFP<sup>+</sup>) et les cellules n'ayant pas reçu de sh-RNA (qui sont donc GFP<sup>-</sup>). Ce lentivirus a été utilisé pour infecter des expansions de cellules iNKT et V $\beta$ 2 lancées à partir de cellules de témoins. En parallèle, on utilise un sh-RNA contrôle. Pour vérifier l'efficacité d'extinction du sh-RNA, l'expression intracellulaire de XIAP a été analysée par cytométrie. Avec le sh-RNA contrôle, on ne voit pas de variation, que les cellules soient transduites ou pas, dans l'expression intracellulaire de XIAP. En revanche, les cellules ayant été transduites avec le sh-RNA XIAP présentent une expression réduite de XIAP (figure 22, panel B).



voient leur proportion en cellules GFP<sup>+</sup> diminuer au cours du temps. Ce phénomène est plus marqué avec les cellules iNKT qu'avec les cellules V $\beta$ 2.



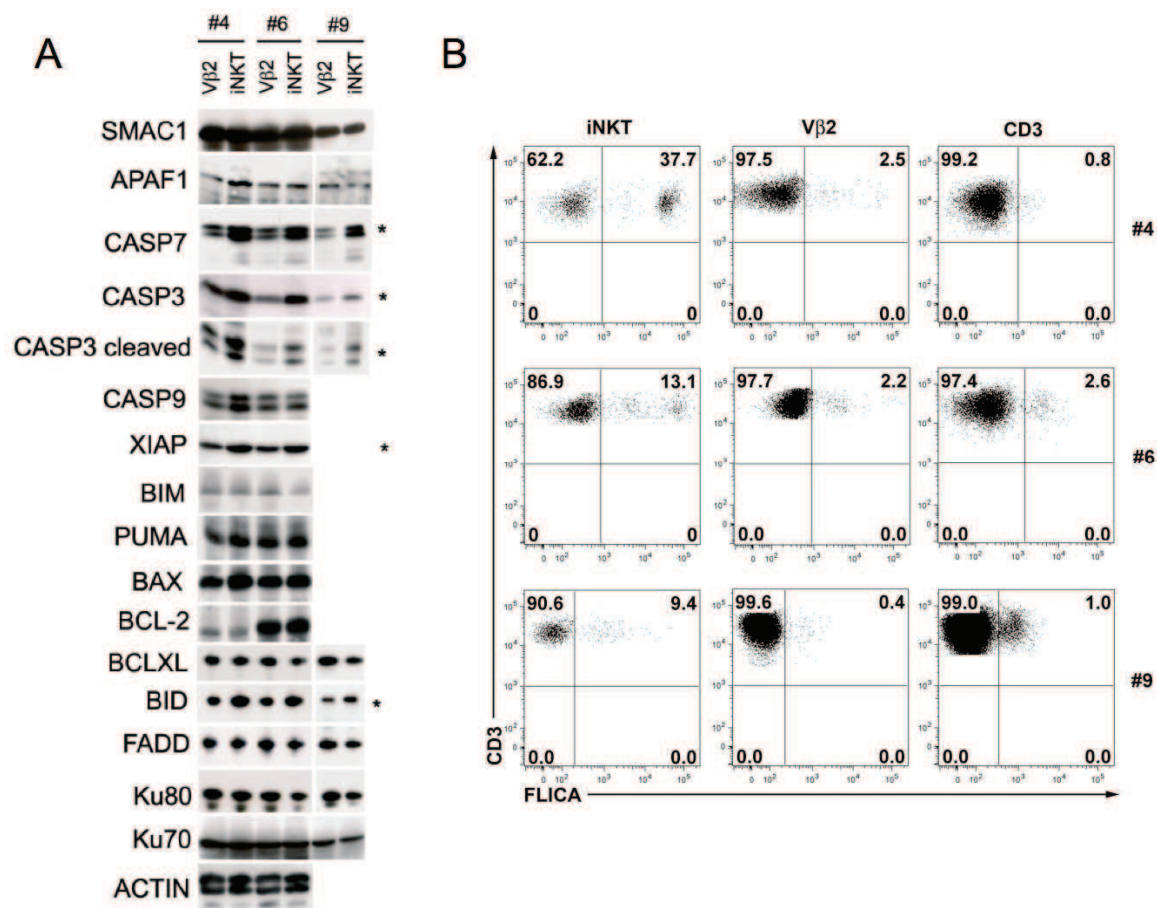
**Figure 23 : Exacerbation de l'apoptose des cellules iNKT après extinction de XIAP.** (A) Apoptose des cellules iNKT et V $\beta$ 2 GFP<sup>+</sup> ou GFP<sup>-</sup> stimulées par un anti-CD3 (10  $\mu$ g/ml). Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes en duplicat avec trois contrôles différents (#6, 9 et 13). \*\*P < 0.01. (B) Apoptose des cellules iNKT et V $\beta$ 2 GFP<sup>+</sup> stimulées par un anti-Fas (100 ng/ml). Les données sont représentatives de deux expériences en duplicat. Stimulation répétée d'expansions transduites. Des expansions transduites ont été stimulées de manière quotidienne avec un anti-CD3 (1  $\mu$ g/ml) (C) ou un anti-Fas (25 ng/ml) (D). Le pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup> a été mesuré chaque jour. Le panel de gauche représente le pourcentage absolu de GFP et le panel de droite représente la perte normalisée de GFP au sein de la culture. Les données sont représentatives de deux expériences.

Les expériences que nous avons pu mener sur le patient XLP-2 et sur les cellules de contrôles transduites montrent qu'en l'absence de XIAP la susceptibilité à l'apoptose des cellules iNKT est plus fortement accrue que pour les cellules T V $\beta$ 2. Les cellules iNKT sont donc plus dépendantes de XIAP que les cellules T conventionnelles pour leur survie en réponse à des stimuli apoptotiques.

#### **6. Expression augmentée de protéines pro-apoptotiques dans les cellules iNKT :**

Nous avons cherché à comprendre les bases moléculaires expliquant l'apoptose plus élevée des cellules iNKT. Nous avons donc analysé l'expression des principales protéines impliquées dans les voies d'apoptose (incluant les caspases et les membres de la famille Bcl-2) dans des expansions de cellules iNKT et V $\beta$ 2 de donneurs sains par western blot après les avoir triées sur colonnes magnétiques. Sur 13 protéines analysées, Bid, la caspase-3 (et sa forme clivée) et la caspase-7 sont plus exprimées dans les cellules iNKT que dans les cellules V $\beta$ 2 des trois expansions testées. L'expression de XIAP est aussi plus élevée dans les cellules iNKT (figure 24, A). On trouvera en annexe 5 une quantification de la surexpression de ces protéines dans les cellules iNKT.

La surexpression des caspases a ensuite été recherchée dans les cellules *ex vivo* en mesurant l'expression de caspases activées par cytométrie. Pour ce faire le réactif FLICA a été utilisé. Fluorescent, ce dernier entre passivement dans les cellules et se fixe sur les caspases activées. Il est ainsi possible par cytométrie de mesurer l'activité des caspases sur des cellules vivantes. En testant les PBMC de trois donneurs, nous avons observé qu'il y a, parmi les cellules iNKT, une proportion de cellules exprimant des caspases activées bien plus importante que parmi les cellules T conventionnelles dans leur ensemble (CD3<sup>+</sup>) ou les cellules T conventionnelle V $\beta$ 2 en particulier (figure 24, B).



**Figure 24 : Etude de l'expression de molécules pro et anti-apoptotique dans les cellules iNKT.** (A) Des lysats cellulaires d'expansions triées de cellules iNKT et Vβ2 de trois contrôles différents ont été analysés par western blot pour l'expression de différentes protéines apoptotiques. \* indique les protéines surexprimées dans les cellules iNKT par rapport aux cellules Vβ2. (B) La détection de l'expression de caspases activées a été faite *ex vivo* sur des cellules iNKT, Vβ2 ou T issues de trois donneurs à l'aide du réactif FLICA.

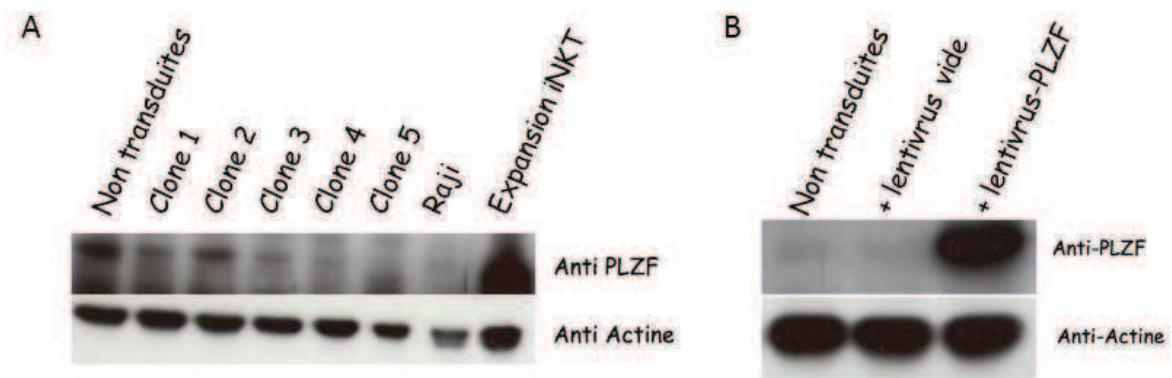
L'ensemble de ces résultats indique donc que les cellules iNKT expriment plus fortement des protéines pro-apoptotiques comme Bid ou les caspases exécutrices 3 et 7 suggérant que cette expression augmentée est une explication de leur phénotype pro-apoptotique.

## 7. Le facteur de transcription PLZF est impliqué dans l'acquisition du phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT :

Nous avons ensuite cherché à décrypter les mécanismes moléculaires responsables du caractère pro-apoptotique des cellules iNKT. Le facteur de transcription PLZF nous a alors semblé être un bon candidat. En effet, il est indispensable au développement des cellules iNKT et à l'acquisition de leurs fonctions effectrices<sup>105,106</sup>. De plus, plusieurs études ont montré un rôle pro-apoptotique de PLZF dans différentes lignées cellulaires<sup>430-432</sup>.



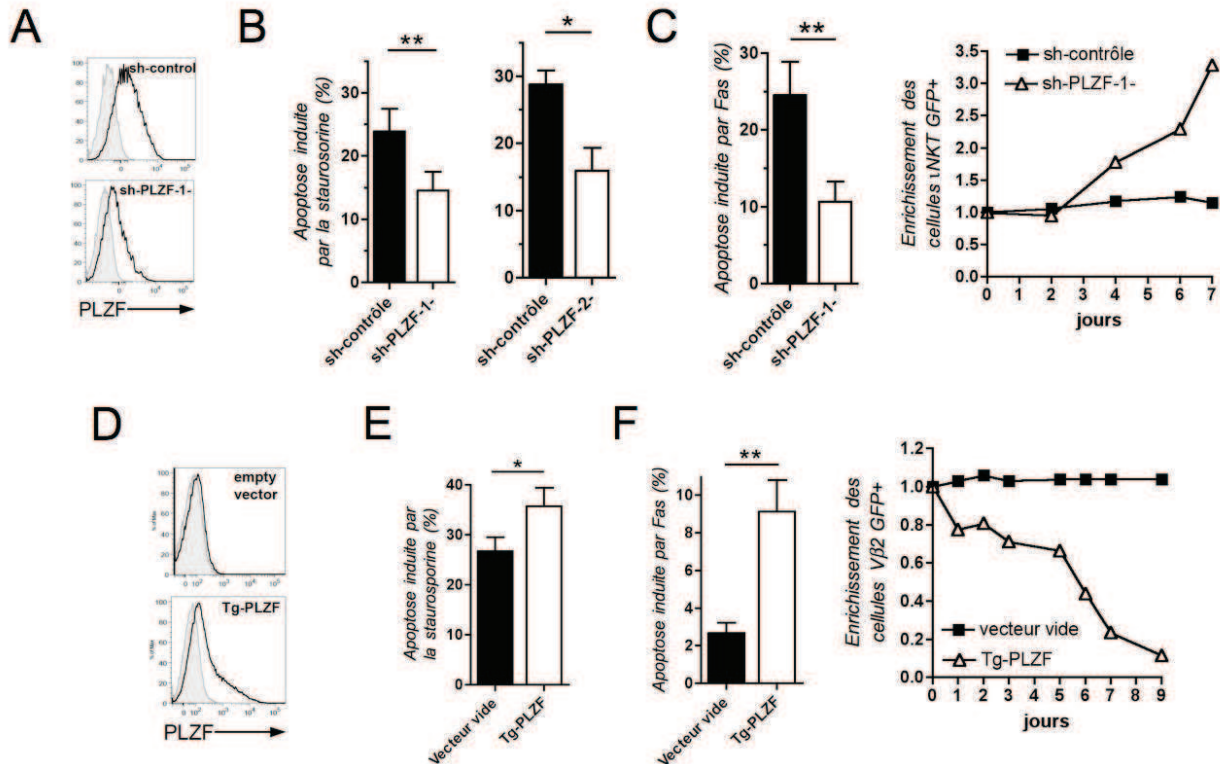
Le rôle de PLZF dans l'acquisition du phénotype pro-apoptotique des iNKT a été évalué avec une approche de sh-RNA. Cinq clones de sh-RNA ont été testés sur des cellules T Jurkat dans lesquelles nous avons mesuré l'expression de PLZF par western blot. En contrôle négatif, nous avons utilisé un lysat de la lignée B Ramos et en contrôle positif, un lysat de cellules iNKT issues d'une expansion triée. Comme le montre la figure 25, les clones 3 et 5 sont les plus efficaces. Nous pouvons noter la très forte expression de PLZF dans les cellules iNKT.



**Figure 25 : Modification de l'expression de PLZF.** (A) Extinction de l'expression de PLZF. Des cellules Jurkat ont été infectées avec 5 lentivirus contenant chacun un clone de sh-RNA anti-PLZF. L'expression de PLZF a été mesurée par western-blot. (B) Surexpression de PLZF. Des cellules Jurkat ont été infectées avec un lentivirus contenant l'ADNc de PLZF ou un lentivirus vide. Les cellules ont été triées en fonction de l'expression de la GFP et ont été lysées. L'expression de PLZF a été mesurée par western blot.

La diminution de l'expression de PLZF par sh-RNA sur des expansions de cellules iNKT donne lieu à une diminution de l'apoptose induite par de la staurosporine ou par Fas (où deux sh-RNA différents ont été testés) (figure 26, A, B et C). Par ailleurs, une stimulation répétée par Fas conduit à un enrichissement de la fraction GFP<sup>+</sup> pour les cellules infectées par un sh-RNA anti-PLZF, alors que pour les cellules infectées avec un sh-RNA contrôle, on ne voit pas de variation du pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup> (figure 26, C). Ces résultats indiquent qu'une diminution de l'expression de PLZF rend les cellules iNKT moins sensibles à l'apoptose. Nous avons ensuite réalisé l'expérience inverse consistant à surexprimer PLZF dans des expansions de lymphocytes T Vβ2. Pour cela, nous avons cloné l'ADNc de PLZF dans un vecteur lentiviral qui contient la GFP comme gène rapporteur. La figure 25, B montre la surexpression de PLZF dans des cellules Jurkat infectées par ce lentivirus. Cette expérience en miroir montre que la surexpression de PLZF dans les cellules T Vβ2 augmente leur susceptibilité à l'apoptose quand celle-ci est induite par de la staurosporine ou par Fas (figure 26, D, E et F). De plus, la stimulation répétée de cellules transduites avec le lentivirus

codant pour PLZF entraîne une diminution de la fraction GFP<sup>+</sup> (figure 26, F), alors que cet effet n'est pas observé dans les cellules transduites avec un lentivirus vide. La surexpression de PLZF dans des cellules T conventionnelles les rend donc plus sensibles à l'apoptose.



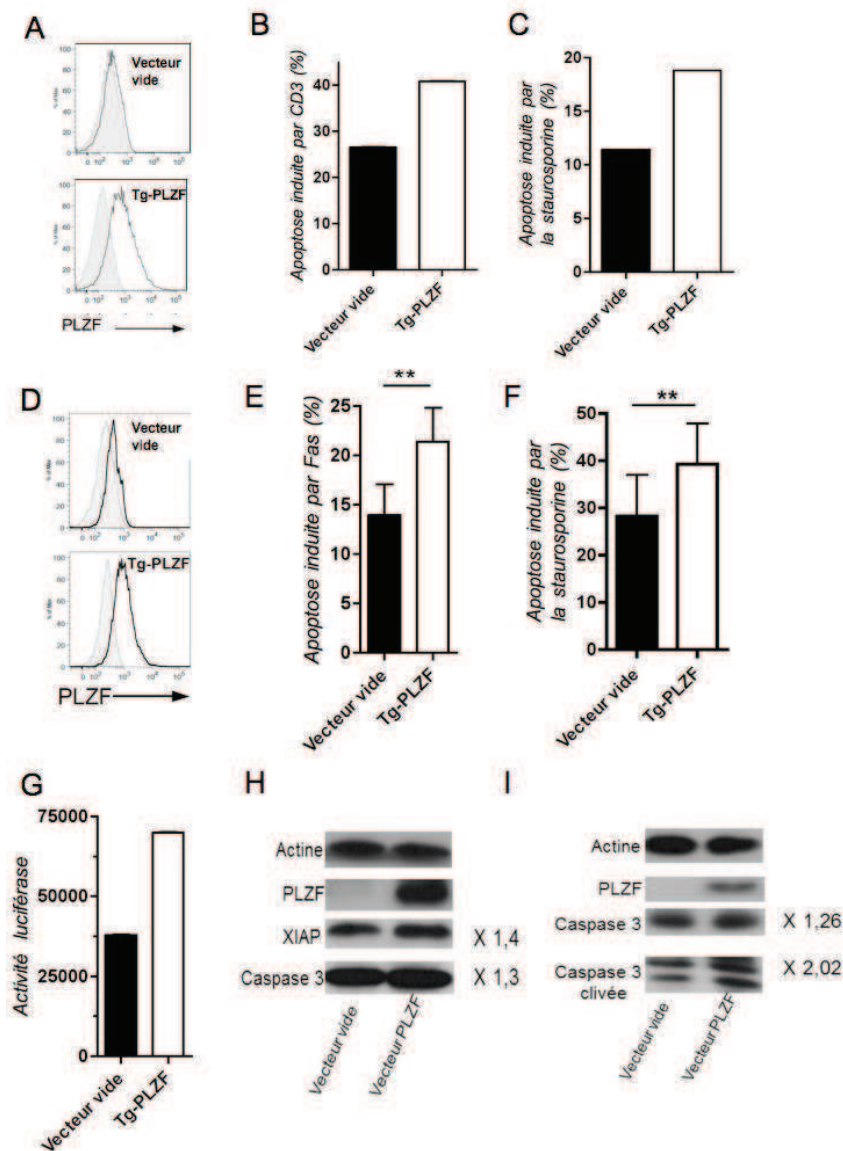
**Figure 26 : Le facteur de transcription PLZF contrôle le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT.**

(A) Expression de PLZF dans la fraction GFP<sup>+</sup> d'expansions de cellules iNKT infectées avec un sh-RNA contrôle ou un sh-RNA anti-PLZF. L'histogramme gris correspond à l'isotype, l'histogramme noir à l'anti-PLZF. Une expérience représentative de quatre. (B) Apoptose induite par de la staurosporine sur la fraction GFP<sup>+</sup> d'expansions infectées avec un sh-RNA contrôle ou deux sh-RNA anti-PLZF (#4, 6 et 9). (C) Apoptose induite par Fas sur la fraction GFP<sup>+</sup> d'expansions infectées avec un sh-RNA contrôle ou un sh-RNA anti-PLZF (panel de gauche). Dans le panel de droite, les cellules ont été stimulées de manière répétée par Fas toutes les 24h et la proportion de cellules GFP<sup>+</sup> a été mesurée par cytométrie. Les résultats ont été normalisés à 100% à t = 0. Une expérience représentative de trois (#4, 6 et 9). (D) Expression de PLZF dans la fraction GFP<sup>+</sup> d'expansions de cellules Vβ2 infectées avec un lentivirus vide ou un lentivirus codant pour PLZF. L'histogramme gris correspond à l'isotype, l'histogramme noir à l'anti-PLZF. Une expérience représentative de quatre. (E) Apoptose induite par de la staurosporine sur la fraction GFP<sup>+</sup> d'expansions infectées avec un lentivirus vide ou par un lentivirus codant pour PLZF. (F) Apoptose induite par Fas sur la fraction GFP<sup>+</sup> d'expansions infectées avec un lentivirus vide ou un lentivirus codant pour PLZF (panel de gauche). Dans le panel de droite, les cellules ont été stimulées de manière répétée par Fas toutes les 24h et la proportion de cellules GFP<sup>+</sup> a été mesurée par cytométrie. Les résultats ont été normalisés à 100% à t = 0. Une expérience représentative de trois. \*P<0.05, \*\*P<0.01.

Nous avons ensuite étendu ces observations à d'autres cellules T. A cet effet, nous avons infecté des blastes PHA ou des cellules de la lignée T Jurkat avec le lentivirus codant pour PLZF. Dans les deux types cellulaires, la surexpression de PLZF rend les cellules plus sensibles à l'apoptose induite par CD3, Fas ou par de la staurosporine (Figure 27, A à F). Enfin, la caspase 3 étant surexprimée dans les cellules iNKT (Figure 24, A), nous avons voulu



voir si elle pourrait être sous le contrôle du facteur de transcription PLZF. Ceci est par ailleurs suggéré par l'étude de Cheung et al. qui montre que la surexpression de PLZF dans des lignées de mésothéliomes malins, conduit à une augmentation du niveau d'expression de la caspase 3<sup>432</sup>. Pour tester cette hypothèse, nous avons transduit des cellules Jurkat TAg (exprimant le *late T antigen* de SV40) avec un lentivirus vide ou un lentivirus codant pour PLZF. Les cellules ont ensuite été triées par FACS pour ne garder que des cellules transduites (GFP<sup>+</sup>). Les cellules ont alors été transfectées avec un plasmide contenant le gène de la luciférase sous contrôle du promoteur de la caspase 3. La surexpression de PLZF entraîne une augmentation significative de l'activité du promoteur de la caspase 3 (Figure 27, G). Nous avons essayé de confirmer ces résultats par western blot : l'expression de la caspase 3 et de sa forme clivée est légèrement augmentée lorsque PLZF est surexprimé dans les Jurkat et dans les Jurkat TAg (figure, H et I). XIAP semble elle aussi légèrement surexprimée comme cela a été observé précédemment dans les expansions de cellules iNKT (figure 22,A).



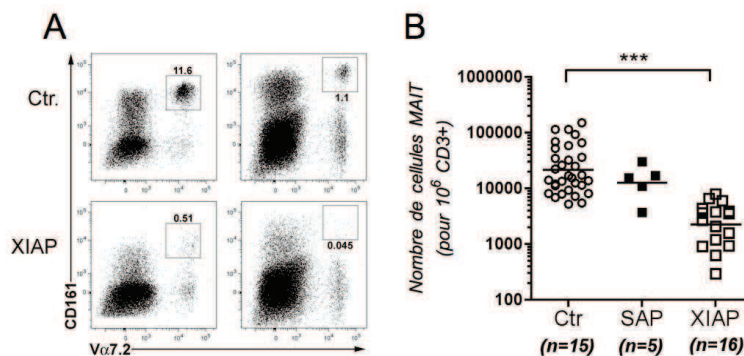
**Figure 27 : PLZF contrôle le phénotype pro-apoptotique des cellules T.** (A) Expression de PLZF dans la fraction GFP<sup>+</sup> de blasts PHA infectés avec un lentivirus vide ou un lentivirus codant pour PLZF. L'histogramme gris correspond à l'isotype, l'histogramme noir à l'anti-PLZF. (B) Apoptose induite par CD3 sur la fraction GFP<sup>+</sup> de blasts PHA infectés avec un lentivirus vide ou un lentivirus codant pour PLZF. Une expérience représentative de deux (#8 et 9) (C) Apoptose induite par de la staurosporine sur la fraction GFP<sup>+</sup> de blasts PHA infectés avec un lentivirus vide ou un lentivirus codant pour PLZF. Une expérience représentative de deux (#8 et 9). (D) Expression de PLZF dans la fraction GFP<sup>+</sup> de cellules Jurkat infectées avec un lentivirus vide ou un lentivirus codant pour PLZF. L'histogramme gris correspond à l'isotype, l'histogramme noir à l'anti-PLZF. (E) Apoptose induite par Fas sur la fraction GFP<sup>+</sup> de cellules Jurkat infectées avec un lentivirus vide ou un lentivirus codant pour PLZF (trois expériences indépendantes en duplicat). (F) Apoptose induite par de la staurosporine sur la fraction GFP<sup>+</sup> de cellules Jurkat infectées avec un lentivirus vide ou un lentivirus codant pour PLZF (trois expériences indépendantes en duplicat). (G) Activité du promoteur de la caspase 3 mesurée par un test de luciférase dans des cellules Jurkat Tag infectées avec un lentivirus vide ou un lentivirus codant pour PLZF (moyenne de deux expériences en quintuplet). (H) Blots de l'expression de l'actine, de PLZF, de XIAP et de la caspase 3 par des cellules Jurkat infectées par un lentivirus vide ou un lentivirus codant pour PLZF. (I) Blots de l'expression de l'actine, de Ku70, de PLZF, de la caspase 3 et de la forme clivée de la caspase 3 par des cellules Jurkat Tag infectées par un lentivirus vide ou un lentivirus codant pour PLZF. Pour (H) et (I), les chiffres à droite des blots correspondent au facteur de surexpression des protéines dans les cellules infectées par le lentivirus codant pour PLZF par rapport aux cellules infectées par le lentivirus vide en prenant l'actine comme référence. Ces chiffres ont été obtenus par quantification des intensités de bandes par le logiciel ImageJ.

\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001.

Nos données indiquent donc que le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT est contrôlé en partie par le facteur de transcription PLZF qui a la capacité d'activer l'expression de la caspase 3.

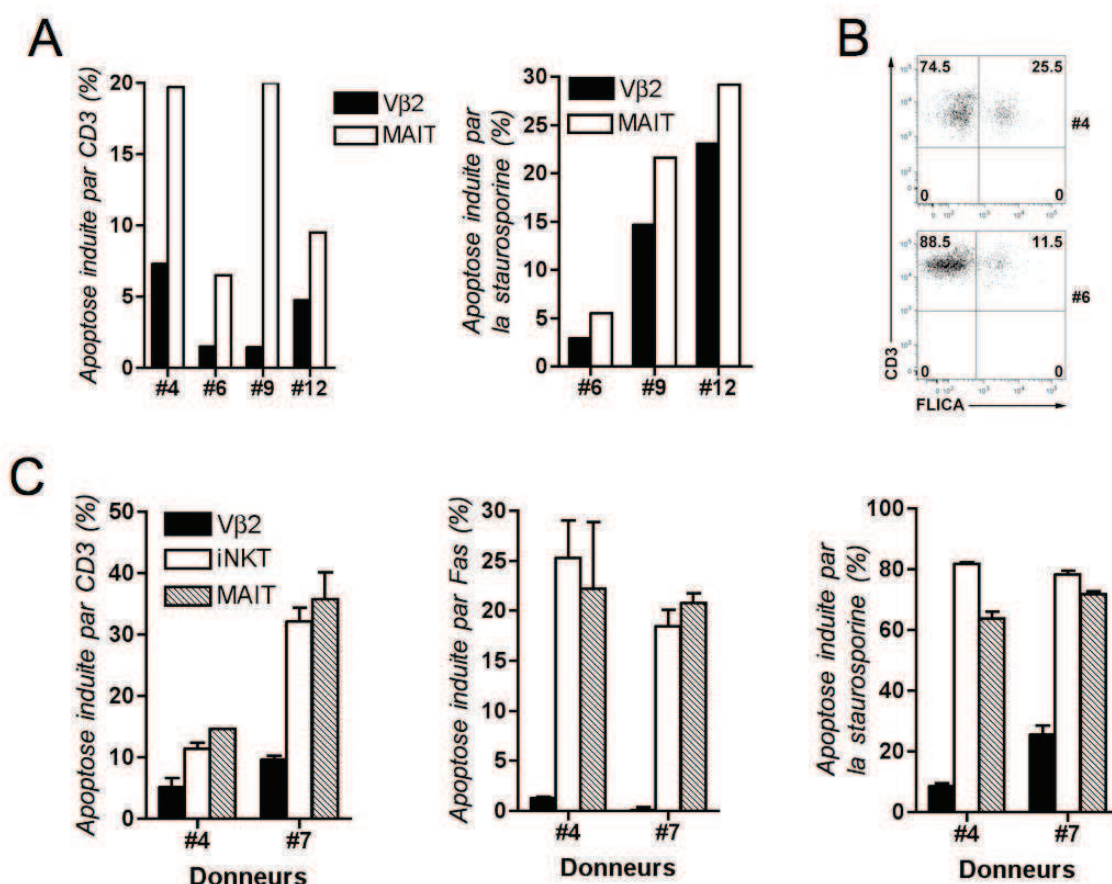
### 8. Les cellules MAIT ont un phénotype pro-apoptotique similaire à celui des cellules iNKT :

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les cellules MAIT représentent une seconde population de cellules T invariantes partageant de nombreuses caractéristiques avec les cellules iNKT : l'expression d'un TCR semi-invariant ( $V\alpha 7.2$ - $J\alpha 33$  chez l'homme et  $V\alpha 19$ - $J\alpha 33$  chez la souris), l'expression de marqueurs de la famille NK comme CD161, un phénotype effecteur/mémoire, la restriction par MR1, une molécule de classe I non conventionnelle comme CD1d, et la rapide production de cytokines suite à leur stimulation. Nous avons cherché à déterminer si les cellules MAIT comme les cellules iNKT présentaient un caractère pro-apoptotique. Les cellules MAIT sont détectées par la combinaison suivante d'anticorps : anti-CD3, anti-CD161 et anti- $V\alpha 7.2$  (figure 28, A). Chez les patients XLP-2, le nombre de cellules MAIT est réduit d'un facteur 10 en périphérie par rapport à des témoins (figure 28, B) suggérant qu'elles sont dépendantes de XIAP pour leur survie comme les cellules iNKT. Chez les patients XLP-1, on observe une légère diminution, mais qui n'est pas significative. Nous pouvons par ailleurs faire la même observation que pour les cellules iNKT : les patients portant une mutation hypomorphe de *XIAP* ont un nombre de cellules MAIT plus élevé. Cependant, il n'y a que peu de patients hypomorphes testés (annexe 1, figure 38).



**Figure 28 : Les patients XLP-2 ont un nombre réduit de cellules MAIT.** (A) Analyse par cytométrie des cellules MAIT issues de PBMC de deux contrôles et de deux patients XLP-2. Les cellules MAIT sont détectées par la combinaison  $CD3^+V\alpha 7.2^+CD161^+$ . (B) Comparaison du nombre de cellules MAIT parmi les cellules  $CD3^+$  de PBMC de contrôles (Ctr, n=15), de patients XLP-1 (SAP, n=5) et de patients XLP-2 (XIAP, n=9). \*\*\*  $P < 0.001$ .

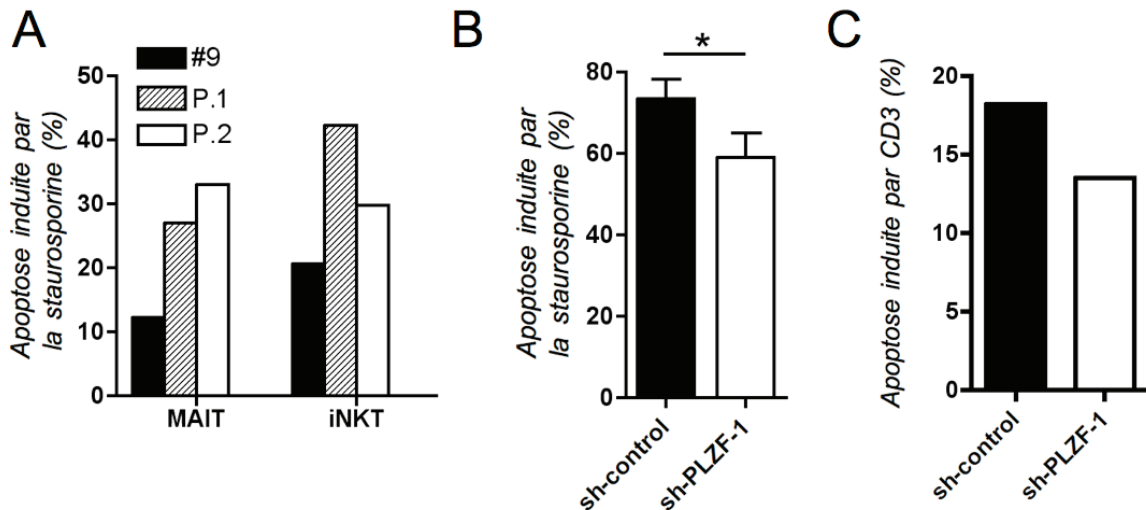
Nous avons alors analysé l'apoptose *ex vivo* de ces cellules suite à une stimulation par CD3 ou par de la staurosporine. Les cellules MAIT ont une apoptose induite plus forte que celle de cellules V $\beta$ 2 et similaire à celle des cellules iNKT (figure 29, A). De la même manière que pour les cellules iNKT, la proportion de cellules MAIT *ex vivo* exprimant des caspases activées est plus importante que celle parmi les cellules T V $\beta$ 2 conventionnelles (figure 29, B). Cette proportion est comparable à celle des cellules iNKT dans la figure 24. Nous avons aussi testé l'apoptose de cellules MAIT qui subsistent dans les expansions iNKT. En réponse à un anti-CD3, un anti-Fas et à la staurosporine, le taux d'apoptose des cellules MAIT est plus élevé que pour les expansions de cellules V $\beta$ 2 et encore une fois comparable à celui des cellules iNKT (figure 29, C).



**Figure 29 : Les cellules MAIT ont comme les cellules iNKT un phénotype pro-apoptotique.** (A) Des PBMC de 4 contrôles ont été stimulées par un anti-CD3 (10  $\mu$ g/ml) ou par de la staurosporine (0,5  $\mu$ g/ml). L'apoptose des cellules MAIT et des cellules V $\beta$ 2 a été mesurée par cytométrie. (B) L'expression de caspases activées a été faite *ex vivo* sur des cellules MAIT issues de deux donneurs à l'aide du réactif FLICA. (C) Analyse de l'apoptose de cellules MAIT dans les cultures de cellules iNKT stimulées par un anti-CD3 (10  $\mu$ g/ml), un anti-Fas (100 ng/ml) et de la staurosporine (0,5  $\mu$ g/ml). Les barres d'erreurs correspondent à des duplicats d'expérience.

Nous avons alors étudié plus spécifiquement le rôle de XIAP dans l'apoptose des cellules MAIT. Les cellules MAIT *ex vivo* de deux patients XLP-2 montrent une apoptose

supérieure à celle de cellules d'un témoin (figure 30, A). Enfin, les cellules MAIT exprimant comme les cellules iNKT le facteur de transcription PLZF, nous avons cherché à voir le rôle de PLZF dans l'apoptose des cellules MAIT. De la même manière que pour les cellules iNKT, la diminution de l'expression du facteur de transcription PLZF par une approche de sh-RNA diminue l'apoptose des cellules MAIT induite par de la staurosporine ou par CD3 (figure 30, B et C).



**Figure 30 : XIAP et PLZF régulent l'apoptose des cellules MAIT.** (A) Apoptose *ex vivo* de cellules iNKT et MAIT d'un contrôle et de deux patients XLP-2 stimulées par de la staurosporine (0,25 µg/ml) pendant 8h. (B) Apoptose de cellules MAIT infectées par un sh-RNA contrôle ou par un sh-RNA de PLZF stimulées par de la staurosporine (0,25 µg/ml). Les données représentent la moyenne de quatre expériences indépendantes avec deux contrôles différents (#21 et 22). \*P < 0.05. (C) Apoptose de cellules MAIT infectées par un sh-RNA contrôle ou par un sh-RNA de PLZF stimulées par un anti-CD3 (10 µg/ml). Une expérience représentative de quatre expériences indépendantes avec deux contrôles différents (#21 et 22).

Nos résultats indiquent donc que les cellules MAIT, comme les cellules iNKT, sont plus sensibles à l'apoptose et ce phénotype pro-apoptotique est également régulé par XIAP et PLZF.

### 9. Même si elles sont plus sensibles à l'apoptose que les cellules T $\alpha\beta$ , les cellules T $\gamma\delta$ ne semblent pas être dépendantes de XIAP :

Les cellules T  $\gamma\delta$  sont considérées comme des cellules T avec des propriétés innées de par leur mode de reconnaissance des antigènes ou encore de par l'existence de sous-populations ayant un TCR restreint. Cependant, comme le montre la figure 43 en annexe 6, les patients XLP-2 ne présentent pas de déficit clair en cellules T  $\gamma\delta$ . Nous avons aussi testé la sensibilité des cellules T  $\gamma\delta$  à l'apoptose en stimulant *ex vivo* des cellules de deux donneurs

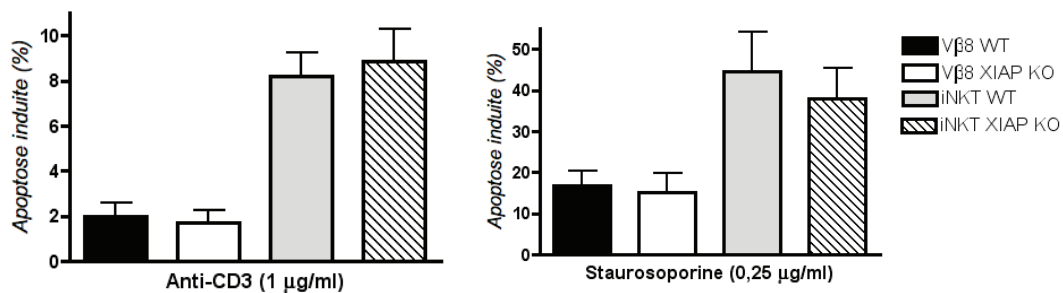
par un anti-CD3 ou par de la PHA (annexe 6, figure 44). Avec les deux types de stimulation, les cellules iNKT et MAIT ont une apoptose plus élevée que les cellules T conventionnelles  $\alpha\beta$ . Les cellules T  $\gamma\delta$  ont également une apoptose plus élevée que les cellules T conventionnelles  $\alpha\beta$  bien que le phénomène soit moins marqué que pour les cellules iNKT et MAIT.

L'ensemble de nos résultats chez l'homme indique donc que les cellules iNKT et les cellules MAIT sont des cellules plus sensibles à l'apoptose que des cellules T conventionnelles. Elles expriment plus de caspases activées, ce qui peut expliquer cette apoptose accrue en cas de stimuli apoptotiques. Nous avons aussi montré que XIAP est un régulateur crucial de l'apoptose pour ces deux types cellulaires. La protéine XIAP est en effet importante pour la survie et l'homéostasie des cellules iNKT et des cellules MAIT. Enfin, le facteur de transcription PLZF qui est spécifiquement exprimé dans les cellules iNKT et MAIT participe à l'acquisition de leur phénotype pro-apoptotique notamment par sa capacité à activer l'expression de la caspase 3. Les cellules T  $\gamma\delta$  sont aussi plus sensibles à l'apoptose que des cellules T conventionnelles  $\alpha\beta$ , mais elles semblent être dépendantes d'un autre facteur que XIAP pour leur survie. D'ailleurs, en analysant régulièrement des PBMC stimulés par de la PHA nous avons vu que les cellules iNKT, MAIT et dans une moindre mesure les cellules T  $\gamma\delta$  disparaissent les premiers jours de culture (annexe 7), ce qui traduit leur plus grande susceptibilité à l'apoptose. Au cours du temps les cellules T  $\gamma\delta$  finissent par réapparaître alors que les cellules iNKT et MAIT ne remontent qu'à des niveaux faibles. Le tableau 7 donne le nombre des cellules iNKT, MAIT et T  $\gamma\delta$  avant stimulation. Il montre que les pourcentages de départ des trois types cellulaires sont comparables.



**B. LES CELLULES iNKT DE SOURIS ONT, COMME CHEZ L'HOMME, UN PHÉNOTYPE PRO-APOPTOTIQUE MAIS QUI N'EST PAS RÉGULÉ PAR XIAP :**

Nous avons étendu nos observations aux cellules iNKT chez la souris. Nous avons donc stimulé des splénocytes de souris sauvages et XIAP KO par un anti-CD3 ou par de la staurosporine. La souris XIAP KO a en effet un nombre normal de cellules iNKT<sup>346</sup>. Nous avons choisi comme population de cellules T conventionnelles la population T exprimant la chaîne Vβ8 car il s'agit de l'équivalent de la population humaine de lymphocytes T exprimant la chaîne Vβ2. Dans les deux cas, nous avons observé que comme chez l'homme, les cellules iNKT murines *ex vivo* sont plus sensibles à l'apoptose que les cellules T conventionnelles. Contrairement à la situation humaine, l'absence de XIAP ne donne pas lieu à une apoptose plus élevée chez la souris, que ce soit pour les cellules T conventionnelles ou pour les cellules iNKT (figure 31).

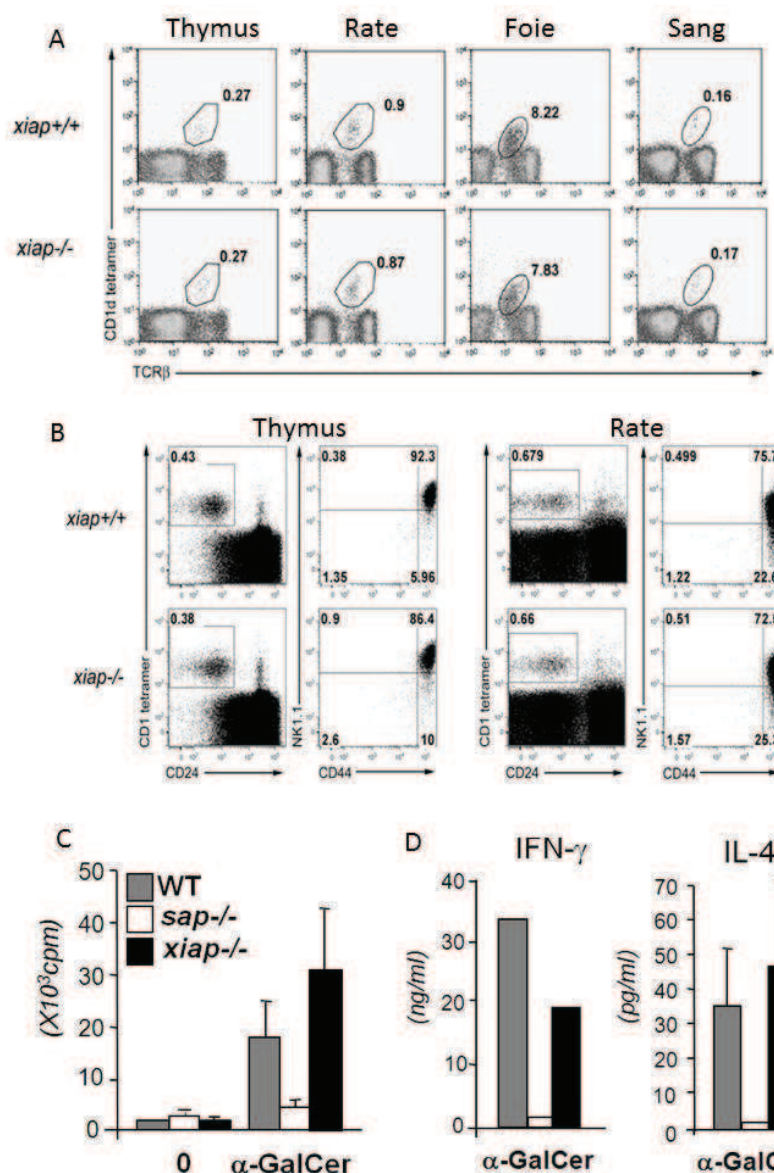


**Figure 31 : Apoptose *ex vivo* de splénocytes de souris.** Des splénocytes de souris sauvages et KO ont été stimulés pendant 18h par un anti-CD3 (panel de gauche) ou de la staurosporine (panel de droite). L'apoptose des cellules Vβ8 et des cellules iNKT a ensuite été mesurée par cytométrie. Les données sont la moyenne de 2 expériences indépendantes. Chaque expérience a été faite sur deux souris en duplicat.

L'étude chez la souris montre que comme chez l'homme, les cellules iNKT ont un phénotype pro-apoptotique. Cependant, ce phénotype ne semble pas régulé par XIAP. Cette absence de régulation par XIAP est confortée par l'analyse des cellules iNKT chez la souris déficiente en XIAP. Chez elle, les cellules iNKT sont en nombre normal dans tous les organes ou en périphérie (figure 32, A). Par ailleurs, le développement ne semble pas perturbé comme le montre l'étude des marqueurs d'activation CD24, CD44 ou NK1.1 dans le thymus ou la rate (figure 32, B). De plus, les cellules iNKT détectées sont fonctionnelles. La prolifération des thymocytes de souris sauvages, SAP KO et XIAP KO a été mesurée suite à une injection d'αGalCer. Comme attendu, les thymocytes de la souris SAP KO (qui n'a pas de cellules iNKT) ne prolifèrent pas en réponse à l'αGalCer<sup>94</sup>. En revanche, les thymocytes de la souris XIAP KO répondent de manière comparable à ceux de la souris sauvage (figure 32, C). Nous



avons aussi testé la capacité des cellules iNKT à produire des cytokines *in vivo* après une injection intra-péritonéale d' $\alpha$ GalCer. Là encore, la production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  par les cellules iNKT de souris XIAP KO est normale et comparable à celle obtenue dans des souris sauvages. Par contre, et comme attendu, la production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  n'est pas détectée dans les souris SAP KO dans ces conditions (figure 32, D).



**Figure 32 : La souris XIAP KO ne présente pas de défaut du compartiment des cellules iNKT.** (A) Des cellules du thymus, de la rate, du foie et du sang de souris sauvages et KO ont été marquées par un anti TCR $\beta$  et par le tétramère de CD1d chargé en  $\alpha$ GalCer. (B) Des thymocytes de souris sauvages et XIAP KO ont été marqués par un anti-CD24, un anti-NK1.1, un anti-CD44 et le tétramère de CD1d chargé en  $\alpha$ GalCer. Après avoir sélectionné la population Tétramère positive CD24 négative, l'expression de NK1.1 et CD44 a été observée. (C) De l' $\alpha$ GalCer a été injecté à des souris sauvages, SAP KO et XIAP KO. Les souris ont été sacrifiées et la prolifération des thymocytes a été mesurée. (D) De l' $\alpha$ GalCer a été injecté à des souris sauvages, SAP KO et XIAP KO. Les souris ont été sacrifiées et la production d'IL-4 et d'IFN- $\gamma$  par les thymocytes a été mesurée. Les panels C et D sont issus d'expériences de Sophie Sibéril.

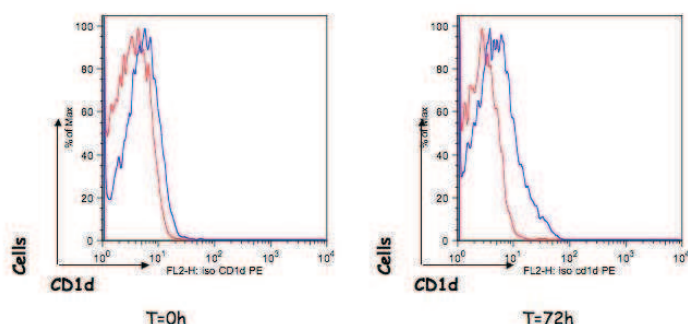
En conclusion, les cellules iNKT murines ne dépendent pas de XIAP pour leur développement ou leurs fonctions. De la même manière que chez l'homme, les cellules iNKT sont plus sensibles à l'apoptose que des cellules T conventionnelles. En revanche, les cellules iNKT murines ne semblent pas dépendre de XIAP pour leur survie. De manière générale, l'absence de XIAP ne paraît pas modifier l'apoptose des cellules T. Ceci est en accord avec les quelques études effectuées sur la souris XIAP KO qui n'ont pas mis en évidence de clair excès d'apoptose dans les cellules déficientes en XIAP<sup>418,422</sup>.

### **C. UN RÔLE DES CELLULES iNKT DANS LE CONTRÔLE DE L'INFECTION PAR L'EBV CHEZ L'HOMME :**

L'absence ou tout du moins la forte diminution du nombre de cellules iNKT est un point commun entre les patients déficients en SAP et déficients en XIAP. De plus, le patient XLP-2 P1 qui n'a pas rencontré l'EBV a un nombre normal de cellules iNKT, suggérant que d'une part la diminution des cellules iNKT chez les patients XLP-2 puisse être consécutive à l'infection par l'EBV et que d'autre part les cellules iNKT jouent un rôle dans le contrôle de l'infection par l'EBV. Cette seconde hypothèse peut être étayée par le fait qu'au cours d'autres déficits immunitaires primitifs caractérisés par une susceptibilité particulière à l'infection par l'EBV, le nombre de cellules iNKT en périphérie est fortement réduit. On peut citer les déficits en WASP<sup>124</sup> ou ITK<sup>101</sup>. Nous nous sommes donc intéressés au rôle des cellules iNKT dans l'immunité anti-EBV.

#### **1. L'expression de CD1d est augmentée à la surface des cellules B activées :**

La molécule CD1d est principalement exprimée par les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B<sup>22,23</sup>. Ces dernières étant la cible privilégiée de l'EBV<sup>433</sup>, nous nous sommes y particulièrement intéressés. Nous avons d'abord déterminé si une activation des cellules B est capable de modifier l'expression de surface de CD1d. Ce phénomène pourrait en effet être utile dans le cas d'une activation des cellules B lors d'une infection virale, comme par l'EBV, pour servir de cibles aux cellules iNKT. Les cellules B ont été activées en présence d'IL-4, de CD40L et d'anti-IgM. Nous pouvons voir sur la figure 33 qu'après 72h d'activation, l'expression de CD1d est plus forte sur les cellules B.



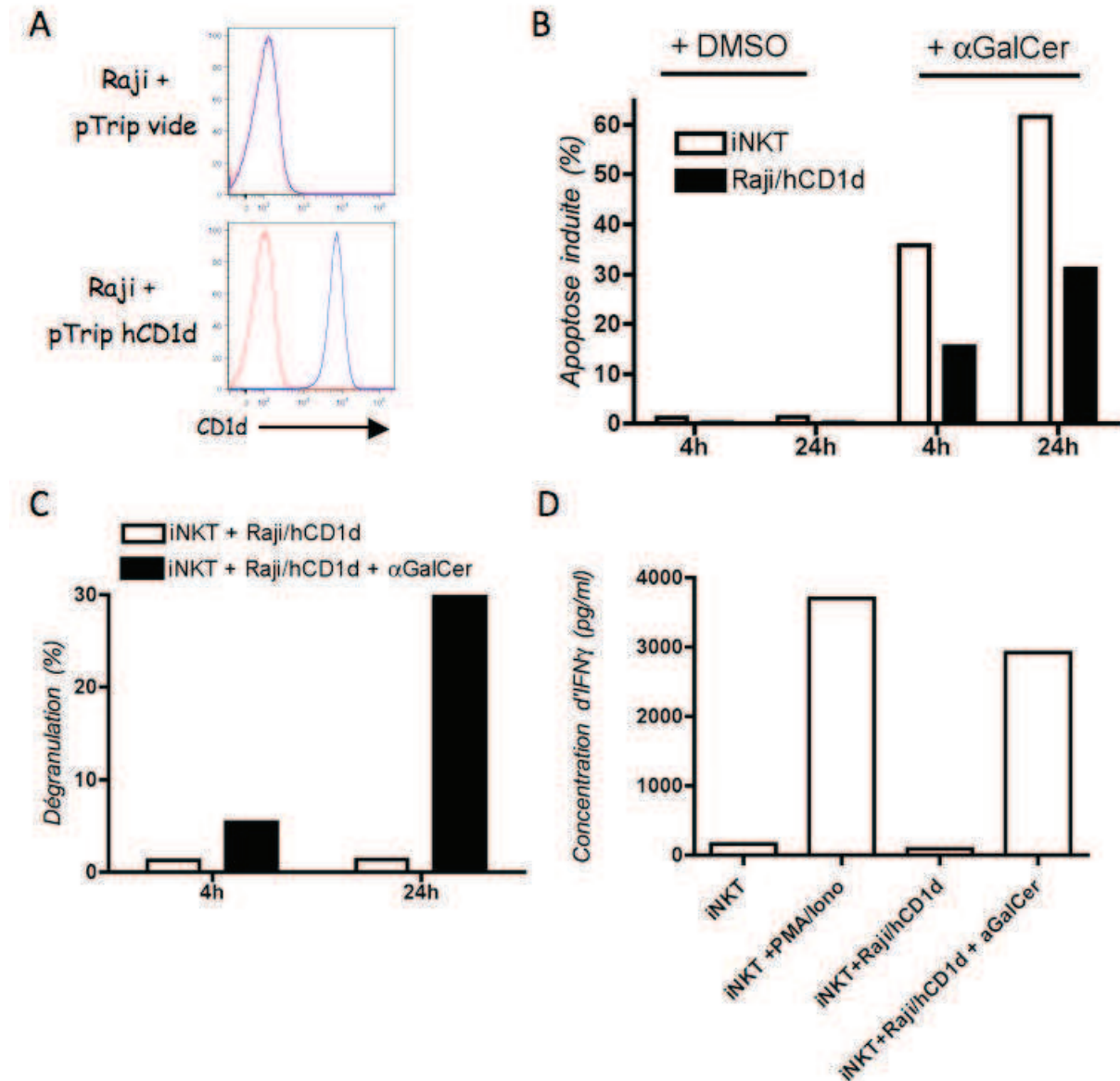
**Figure 33 : L'expression de CD1d est augmentée sur des cellules B activées.** Des PBMC de contrôles ont été cultivées 3 jours en présence d'IL-4 (100U/ml), de CD40L (500 ng/ml) et d'anti IgM (500 ng/ml). Au bout de 72h, l'expression de CD1d a été mesurée sur les cellules B. L'histogramme rouge correspond au contrôle isotypique et l'histogramme bleu à l'anti-CD1d. Les données sont représentatives de trois expériences avec trois donneurs différents.

L'activation des cellules B peut donc induire une augmentation de la molécule CD1d à leur surface.

## **2. Les cellules iNKT sont activées en présence de cibles exprimant CD1d :**

Les cellules iNKT sont capables d'avoir une action cytotoxique directe ou indirecte par l'activation des cellules NK<sup>434,435</sup>. Nous avons cherché à évaluer l'action de cellules iNKT sur des cibles potentielles. Nous avons pour cela utilisé la lignée B Raji qui est une lignée issue d'un lymphome de Burkitt. Cette lignée n'exprime pas CD1d (cf. figure 35). Pour mettre en évidence une réponse des cellules iNKT face à des cibles exprimant CD1d, nous avons transduit cette lignée avec un vecteur lentiviral contenant le gène codant le CD1d humain et le gène codant la GFP comme gène rapporteur ou avec un vecteur vide (figure 34, A). Ces cellules ont été utilisées pour effectuer des expériences de co-cultures. Afin de simuler la présentation d'un ligand par des cellules B aux cellules iNKT, ce qui pourrait se produire dans le cas d'une activation des cellules B par une infection par l'EBV, nous avons utilisé le système artificiel suivant : des cellules iNKT obtenues après expansion sont mises en co-culture avec des cellules Raji, exprimant ou non le CD1d humain. Les cellules B ont été au préalable pré-chargées ou non en  $\alpha$ GalCer. Nous avons alors analysé l'état d'apoptose des cellules cibles et des cellules iNKT suite à une co-culture de 4h et de 24h. Dans ces conditions, nous observons une apoptose des cellules cibles et des cellules iNKT en présence d' $\alpha$ GalCer uniquement (figure 34, B). Enfin, la dégranulation (exocytose des granules cytotoxiques) (figure 34, C) et la production d'IFN- $\gamma$  (figure 34, D) des cellules iNKT en présence de cellules Raji exprimant CD1d ont aussi été analysées. Dans les conditions où il n'y a pas d'expression exogène de CD1d, nous n'observons, ni apoptose, ni dégranulation, ni production d'IFN- $\gamma$  que les cellules soient pré-chargées ou non en  $\alpha$ GalCer.

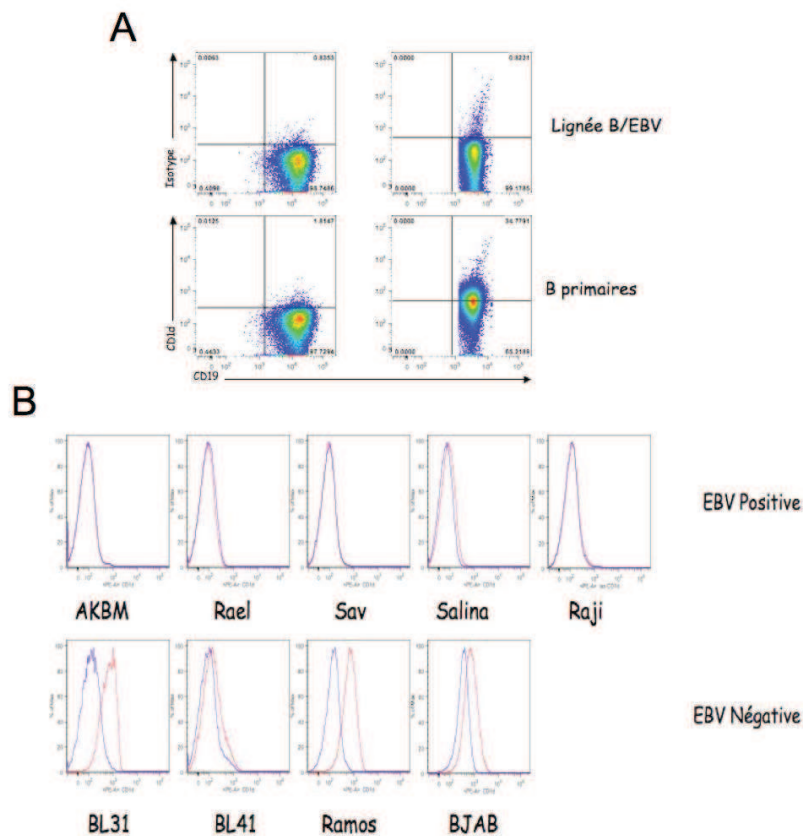
Les cellules iNKT sont activées par la reconnaissance de cellules exprimant CD1d en présence d' $\alpha$ GalCer puisqu'elles produisent de l'IFN- $\gamma$  et dégranulent. L'exocytose des granules cytotoxiques s'accompagne de la mort des cellules B (figure 34). Ces résultats indiquent que les cellules iNKT sont capables de tuer des cibles comme des lymphocytes B présentant de l' $\alpha$ GalCer via CD1d. Enfin, ces observations nous indiquent que les cellules iNKT entrent également fortement en apoptose à la suite de cette activation comme attendu au vu de leur caractère pro-apoptotique précédemment démontré.



**Figure 34 : Activation des cellules iNKT en présence de lymphocytes B Raji présentant de l' $\alpha$ GalCer via CD1d.** (A) La lignée B Raji a été infectée avec un lentivirus contenant l'ADNc de CD1d. Le lentivirus possède le gène de la GFP comme gène rapporteur. L'expression de CD1d a ensuite été analysée par cytométrie de flux après avoir trié les cellules GFP<sup>+</sup>. L'histogramme rouge correspond à l'isotype et l'histogramme bleu à l'anti-CD1d. (B) Des cellules iNKT obtenues à partir d'une expansion d'un contrôle ont été triées sur colonne magnétique. Les cellules ont ensuite été mises en co-culture avec des cibles Raji exprimant ou non CD1d et pré-chargées ou non en  $\alpha$ GalCer pendant 4h et 24h. L'apoptose des cellules iNKT et Raji a alors été mesurée par rapport à la condition sans  $\alpha$ GalCer. Les données sont représentatives de quatre expériences. (C) La dégranulation des cellules iNKT a été mesurée lors d'une expérience de co-culture. Les données sont représentatives de deux expériences. La mesure de la dégranulation se fait par l'étude des marqueurs CD107a et b, normalement exprimés à l'intérieur des granules, à la surface des cellules stimulées<sup>436</sup> (D) La production d'IFN- $\gamma$  dans le surnageant au bout de 24h de ces co-cultures a été mesurée par ELISA. Les données sont représentatives de cinq expériences. La condition PMA/Iono correspond au contrôle positif de l'activation des cellules iNKT par de la PMA et de la ionomycine.

### 3. Modulation de l'expression de CD1d par l'EBV :

Comme nous l'avons vu en introduction, différents virus, dont les herpesvirus, sont capables d'altérer l'expression de surface de CD1d, que ce soit en dégradant CD1d ou en interférant avec son trafic intracellulaire. Nous avons alors voulu voir si l'EBV a aussi cette propriété d'échappement aux cellules iNKT. Nous avons comparé l'expression de CD1d par des cellules B primaires à celle de cellules transformées par l'EBV (cellules B/EBV). Contrairement aux cellules primaires, les cellules B/EBV n'expriment que très peu CD1d (figure 35, A). Nous avons analysé d'autres lignées B. Ces lignées sont toutes issues de lymphomes de Burkitt et peuvent être EBV<sup>+</sup> ou EBV<sup>-</sup>. Les lignées exprimant du CD1d sont majoritairement EBV<sup>-</sup>, alors que celles qui n'ont quasiment pas de CD1d à leur surface sont EBV<sup>+</sup> (Figure 35, B).



**Figure 35 : L'expression de CD1d est diminuée en présence de l'EBV.** (A) L'expression de CD1d a été mesurée sur des lignées B/EBV ou sur des cellules B primaires. Chaque image est représentative de 5 expériences différentes avec 5 lignées et 5 donneurs différents. (B) Différentes lignées B issues de lymphomes de Burkitt ont été marquées pour l'expression de CD1d par cytométrie de flux. L'histogramme bleu correspond au contrôle isotypique et l'histogramme rouge correspond à l'anti-CD1d. Les données sont représentatives de deux expériences indépendantes.

Nos résultats suggèrent donc que l'EBV est probablement capable de diminuer l'expression de surface de CD1d sur des cellules B.

Au total, l'ensemble de nos expériences indique qu'en cas d'activation, les cellules B ont une expression de surface augmentée de CD1d. Par ailleurs, les cellules iNKT sont capables de reconnaître des cibles B exprimant CD1d. Cette reconnaissance se traduit par une dégranulation des cellules iNKT, une sécrétion d'IFN- $\gamma$  et la mort des cellules cibles. De plus, des lignées B infectées par l'EBV n'expriment quasiment pas de CD1d suggérant un mécanisme d'échappement aux cellules iNKT de l'EBV. Ce mécanisme indique de manière indirecte que les cellules iNKT peuvent jouer un rôle dans l'immunité anti-EBV. L'ensemble de ces résultats est un argument en faveur d'une action des cellules iNKT sur des cibles infectées par un virus comme l'EBV. Par ailleurs, conformément à leur phénotype pro-apoptotique, les cellules iNKT lorsqu'elles sont activées par la reconnaissance d'une cible entrent massivement en apoptose.



### **III. DISCUSSION :**

#### **A. MISE EN EVIDENCE DU PHENOTYPE PRO-APOPTOTIQUE DES LYMPHOCYTES iNKT ET MAIT ET DE LEUR DEPENDANCE EN XIAP :**

Cette étude a permis d'identifier la protéine anti-apoptotique XIAP et le facteur de transcription PLZF comme des molécules clés dans l'homéostasie des cellules T invariantes chez l'homme. Elle a également clairement démontré que les cellules iNKT et MAIT sont particulièrement susceptibles à l'apoptose, une caractéristique non partagée avec les cellules T conventionnelles. Cette susceptibilité est retrouvée que l'apoptose soit induite par la voie extrinsèque ou intrinsèque. En accord avec ces observations, l'expression des caspases 3 et 7 et de leurs formes activées est plus forte dans les cellules iNKT à l'état basal. De même, les cellules MAIT expriment plus de caspases activées. Comme les caspases 3 et 7 sont les caspases distales exécutrices qui sont activées par les deux voies de l'apoptose, leur surexpression dans les cellules T invariantes explique probablement le caractère pro-apoptotique de celles-ci.

XIAP n'est pas nécessaire pour le développement des cellules iNKT comme le montre l'étude du patient P1. De plus, même si la capacité de ses cellules iNKT à répondre à une stimulation n'a pas été directement testée, l'expansion de ses cellules iNKT suite à la culture des PBMC de ce patient en présence d' $\alpha$ GalCer indique qu'en l'absence de XIAP, il n'y a pas de défaut d'activation des cellules iNKT par leur TCR. XIAP est par contre nécessaire à la survie des cellules iNKT. Cette dépendance particulière corrèle avec la capacité de XIAP à bloquer l'action des caspases 3 et 7 activées<sup>382,437</sup>. Paulsen et al. ont d'ailleurs montré que XIAP peut empêcher l'activation complète des caspases 3 et 7 dans des cellules T activées<sup>438</sup>. Cependant, diminuer l'expression de XIAP dans des cellules T conventionnelles a un impact beaucoup plus modéré sur leur apoptose que sur celle des cellules iNKT. Ceci est cohérent avec l'expression moins forte des caspases 3 et 7 dans ces cellules. Nous avons aussi pu constater que l'expression de XIAP est plus importante dans les expansions de cellules iNKT que dans les expansions de cellules V $\beta$ 2. Ceci peut suggérer une régulation réciproque de l'expression des caspases et de XIAP : une expression supérieure de XIAP peut bloquer dans une certaine mesure l'activité des caspases dont l'expression est supérieure dans les cellules iNKT, permettant ainsi aux cellules de survivre en périphérie. Le niveau d'expression de XIAP dans les cellules iNKT pourrait d'ailleurs ne pas être saturant et une expression accrue de XIAP pourrait protéger les cellules iNKT contre l'apoptose dans certaines conditions. De

manière concordante, la diminution de l'expression de XIAP entraîne une apoptose plus élevée dans les cellules iNKT, que ce soit chez les patients déficients en XIAP (figure 21) ou dans les expériences d'extinction de l'expression de XIAP par l'utilisation de sh-RNA (figure 23). Cependant, il n'est pas exclu que le rôle de XIAP dans la survie des cellules iNKT et des cellules MAIT ne soit uniquement dû à sa capacité à interférer avec les caspases activées. En effet, XIAP est décrit comme activant la voie NF- $\kappa$ B qui est impliquée dans de nombreuses voies, dont la survie cellulaire<sup>439</sup>.

La régulation de l'état pro-apoptotique des cellules iNKT pourrait aussi se faire par d'autres régulateurs de l'apoptose que XIAP. En effet, l'ajout d'IL-15, dans les expansions de cellules iNKT humaines permet de diminuer l'apoptose des cellules iNKT que ce soit par des stimuli de la voie intrinsèque ou extrinsèque. L'IL-15 a en effet été montré comme importante pour la survie des cellules iNKT en périphérie<sup>112,113</sup>. Cet effet protecteur de l'IL-15 vis-à-vis de l'apoptose a été déjà décrit par la capacité de cette cytokine à augmenter l'expression des facteurs de survie Bcl-2 et Bcl-x<sub>L</sub> dans des cellules NK ou des cellules T<sup>440,441</sup>. Dans le cas des cellules iNKT, cet effet est aussi médié par Bcl-x<sub>L</sub><sup>112</sup>.

Nous avons aussi mis en évidence que le caractère pro-apoptotique des cellules iNKT est partagé par les cellules MAIT, la deuxième population de cellules T invariantes décrite chez l'homme et la souris. Ces deux populations invariantes ont un phénotype activé/mémoire et se comportent comme des cellules innées grâce à leur capacité à produire rapidement de grandes quantités de cytokines. De la même manière que pour les cellules iNKT, les cellules MAIT sont diminuées dans le sang des patients XLP-2 et sont ainsi régulées par le facteur anti-apoptotique XIAP. Le XLP-2 est donc le premier déficit immunitaire décrit associé à un défaut de cellules MAIT.

De manière cohérente avec l'activité anti-apoptotique de XIAP et la susceptibilité à l'apoptose des cellules iNKT et des cellules MAIT, il est intéressant de remarquer que les patients ayant des mutations hypomorphes de *XIAP* ont un nombre significativement plus élevé de cellules iNKT et de MAIT que les patients portant des mutations nulles (sans expression détectable de XIAP) (cf. figure 37 et figure 38, annexe 1). Ces protéines hypomorphes contiennent toutes au moins un domaine important pour l'activité anti-apoptotique de XIAP *in vivo*. Une activité anti-apoptotique résiduelle de la protéine *in vivo* permet donc d'avoir un effet sur le nombre de cellules iNKT et MAIT en périphérie. Ces résultats préliminaires doivent cependant être confirmés par l'étude d'autres patients hypomorphes.

Ce phénotype pro-apoptotique est également partagé par les cellules T  $\gamma\delta$  même s'il est moins marqué que pour les cellules iNKT ou pour les cellules MAIT. Nos premières observations n'ont révélé aucun défaut flagrant de cette population chez les patients XIAP. Cependant, l'étude concernait les cellules T  $\gamma\delta$  dans leur ensemble et non pas des sous-populations particulières comme la population NKT  $\gamma\delta$  chez la souris<sup>286</sup>. Il est possible qu'une sous-population bien particulière de cellules T  $\gamma\delta$  soit elle aussi dépendante de XIAP, et il faudrait pour répondre à cette question étudier l'apoptose au sein des différentes populations de cellules T  $\gamma\delta$ . On ne peut donc exclure que les patients XIAP soient déficients en une sous-population particulière de cellules T  $\gamma\delta$  portant un réarrangement particulier comme, par exemple, les cellules utilisant la chaîne  $\delta 1$  et que l'on retrouve principalement dans la peau chez l'homme<sup>257</sup>. Il est bien sûr aussi envisageable que les cellules T  $\gamma\delta$  dépendent d'autres facteurs que XIAP pour leur survie en périphérie.

Ces observations nous ont poussés à émettre l'hypothèse que la grande variabilité du nombre de cellules iNKT chez les contrôles pourrait être dépendant, au moins à un certain degré, de la sensibilité à l'apoptose des lymphocytes. Pour tester cela, le nombre de cellules iNKT en périphérie chez 20 donneurs a été examiné en parallèle de l'AICD de leurs blastes PHA (annexe 8). Les 20 donneurs sélectionnés ont un nombre variable de cellules iNKT et ont été classés en deux groupes selon qu'ils aient plus (groupe « fort ») ou moins (groupe « faible ») de 1000 cellules iNKT pour  $10^6$  cellules T CD3<sup>+</sup>. Le nombre 1000 a été choisi comme frontière entre les deux groupes puisqu'il correspond à la moyenne du nombre de cellules iNKT chez les donneurs sains (figure 11). La figure 46 montre que le groupe « faible » a une apoptose significativement plus élevée que le groupe « fort » de ses blastes PHA suite à une stimulation par CD3. Le tableau 8 en annexe donne le nombre des cellules iNKT et MAIT des différents donneurs. Ces résultats montrent une corrélation inverse entre le nombre de lymphocytes iNKT en périphérie et le niveau d'AICD des blastes chez ces donneurs. Il est donc possible que des facteurs génétiques impliqués dans les voies d'apoptose influent sur le nombre de cellules iNKT en périphérie chez l'homme. Il a d'ailleurs été montré chez la souris qu'il existe au moins trois loci qui régulent génétiquement le nombre de cellules iNKT<sup>425</sup>. Les données obtenues dans cette étude suggèrent que des facteurs génétiques ou physiologiques qui régulent l'apoptose de cellules T d'un donneur vont avoir un impact sur le nombre de cellules iNKT en périphérie, ce qui est cohérent avec leur grande susceptibilité à l'apoptose.

En revanche, il n'y a pas de corrélation entre le nombre de cellules MAIT en périphérie et le niveau d'apoptose des blastes PHA des donneurs testés. En effet, les donneurs ayant un nombre faible de cellules iNKT n'ont pas forcément un nombre faible de cellules MAIT en périphérie (annexe 8). Cependant, du fait de leur tropisme intestinal, on peut penser que le sang n'est pas le compartiment le plus représentatif du nombre total de cellules MAIT de l'organisme, d'autant plus que ces cellules sont très présentes dans la lamina propria<sup>239</sup>.

Le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT a aussi été observé chez la souris (figure 31). Notre étude s'est néanmoins concentrée sur l'homme car la souris XIAP KO n'a pas d'apoptose plus élevée de ses cellules iNKT. Cette souris n'a d'ailleurs pas de phénotype pro-apoptotique clair (cf. paragraphe sur la souris XIAP KO p. 72). Bien que la protéine XIAP soit hautement conservée entre la souris et l'homme, le rôle de XIAP chez la souris semble être moins important que chez l'homme. Une autre hypothèse serait la redondance chez la souris des différentes IAP, avec une compensation de l'absence de XIAP par cIAP1 et cIAP2 dont la structure est la plus proche de XIAP. Cette compensation était d'ailleurs évoquée dans les premières observations montrant une surexpression de ces deux IAP chez les souris XIAP KO<sup>418</sup>. Enfin, l'existence d'un pseudo gène de *XIAP* identifié sur le chromosome 7 chez la souris pourrait donner lieu à l'existence de polypeptides tronqués ayant la capacité de bloquer l'activité des caspases<sup>442</sup>. En tout cas, en l'absence de XIAP, les cellules iNKT murines se développent normalement et sont fonctionnelles comme l'indiquent nos résultats (figure 32). Contrairement à la situation humaine où les cellules MAIT sont facilement détectées et représentent une fraction non négligeable des lymphocytes T totaux (quelques %), chez la souris les cellules MAIT sont très peu nombreuses et quasiment indétectables (en tout cas chez la souris de laboratoire). Par ailleurs, il n'existe pas pour l'instant d'anticorps capable de détecter les cellules MAIT murines ce qui rend leur étude difficile. Enfin, le ligand de ces cellules n'est toujours pas connu. Pour toutes ces raisons, l'étude de l'apoptose des cellules MAIT chez la souris n'a pas été entreprise.

#### **B. DE L'INTÉRÊT QUE DES CELLULES INNÉES SOIENT PLUS SENSIBLES À L'APOPTOSE :**

Ce travail a donc permis de mettre en évidence le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT, des cellules MAIT et dans une moindre mesure des cellules T  $\gamma\delta$ . Ces trois types cellulaires présentent la caractéristique d'être des lymphocytes T innés, qui sont dans un état préactivé. Ceci leur permet de réagir rapidement lors de la rencontre avec un pathogène. Ces cellules ont aussi la capacité de produire de fortes quantités de cytokines. Or, le fait d'avoir une activation persistante de lymphocytes T peut avoir des effets délétères. C'est le

cas par exemple lors du syndrome d'activation lymphohistiocytaire qui est caractérisé par une activation non contrôlée des lymphocytes cytotoxiques. Ceux-ci sécrètent de grandes quantités de cytokines, notamment de l'IFN- $\gamma$ , qui vont à leur tour activer les macrophages, responsables des signes d'activation lymphohistiocytaire.

Si une pathologie est induite par la persistance d'une activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, il est également possible d'imaginer que la persistance de l'activation d'autres cellules ayant des propriétés cytotoxiques et produisant de grandes quantités de cytokines, telles que les cellules iNKT ou les cellules MAIT, pourrait elle aussi être délétère, d'autant plus que ces cellules sont activées très rapidement en réponse à différents stimuli. On peut alors voir dans leur phénotype pro-apoptotique un moyen de régulation, qui ne bride pas l'intensité de la réponse, mais sa durée. D'ailleurs, l'importance de l'apoptose dans l'homéostasie du système immunitaire est illustrée par l'exemple d'un déficit immunitaire, l'ALPS (*Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome*) dû à un défaut d'apoptose lymphocytaire induite par la voie Fas, qui va entraîner des adénopathies, une splénomégalie et des pathologies auto-immunes<sup>443</sup>.

Il est alors tentant d'extrapoler ce phénotype pro-apoptotique à toutes les cellules dites innées, comme les cellules B1 ou les cellules MZB. Il pourrait être intéressant de voir si la surexpression de XIAP dans des cellules innées a un effet protecteur (dans le cas contraire, l'expression de XIAP serait déjà saturante).

### **C. COMMENT EXPLIQUER CE CARACTÈRE PRO-APOPTOTIQUE SUR LE PLAN MOLÉCULAIRE :**

PLZF est un membre de la famille des protéines BTB-ZF (*Broad complex tramtrack bric-a-brac-Zinc Finger*). Les membres de cette famille de facteurs de transcription comportent des domaines à doigts de zinc C2H2 en combinaison avec un domaine N-terminal BTB qui permet des interactions protéine/protéine. L'activité de régulation transcriptionnelle se fait par la liaison des motifs à doigts de zinc à des régions régulatrices des gènes cibles, et par le recrutement de cofacteurs par le domaine BTB. Ces protéines sont impliquées dans de nombreux phénomènes biologiques, dont le développement du système immunitaire. Ainsi, Bcl6 est nécessaire pour la formation des centres germinatifs<sup>444</sup>, ThPok est nécessaire à la différenciation CD4 des cellules T<sup>445</sup> et LRF contrôle la différenciation lymphocytaire vers la voie T ou B<sup>446</sup>. Quant à PLZF, il s'agit d'un répresseur transcriptionnel<sup>447</sup> impliqué dans la

formation du squelette<sup>448</sup>, le développement du système nerveux<sup>449</sup>, la spermatogénèse<sup>450</sup> et dans le développement de cellules du système immunitaire comme les cellules iNKT<sup>105,106</sup>.

PLZF est en effet nécessaire aux stades précoces du développement des cellules iNKT et à l'acquisition du caractère inné de ces cellules (acquisition du phénotype mémoire et capacité de production de cytokines<sup>105,106</sup>). Chez la souris PLZF KO, le développement des cellules iNKT est altéré : elles n'acquièrent pas de phénotype inné et sont en nombre réduit. PLZF est aussi associé à l'acquisition du caractère inné d'autres types cellulaires comme les cellules T CD4<sup>+</sup> sélectionnées par des interactions thymocyte/thymocyte<sup>302</sup>. Un patient déficient en PLZF a été décrit dans la littérature, et il n'a que très peu de cellules iNKT, ce qui est en accord avec le rôle crucial de PLZF pour le développement des cellules iNKT<sup>108</sup>.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré un rôle de PLZF dans l'apoptose et le cycle cellulaire, et ce facteur de transcription a un rôle suppresseur de tumeur avéré dans plusieurs types de cancers. Ainsi, l'expression de PLZF est diminuée dans des mélanomes<sup>451</sup> et la surexpression de PLZF dans des cellules de carcinomes cervicaux conduit à leur apoptose<sup>452</sup>. De plus, alors que l'expression de PLZF est fortement diminuée dans des mésothéliomes, une expression ectopique de PLZF dans ces mêmes cellules conduit à une augmentation de l'apoptose et à une augmentation de l'expression de la forme clivée de la caspase 3<sup>432</sup> (l'expression de la forme non clivée n'étant pas indiquée dans cette étude). Enfin, dans certaines leucémies aiguës promyélocyaires on retrouve une translocation impliquant les gènes codant pour le récepteur  $\alpha$  de l'acide rétinoïque et pour PLZF. La protéine de fusion qui en résulte a une activité pro-oncogénique qui est en partie due à un effet dominant-négatif sur l'action inhibitrice de PLZF sur l'oncogène c-Myc<sup>453</sup>.

Notre étude a mis quant à elle en évidence un rôle pro-apoptotique de PLZF dans les cellules T innées humaines. Sa forte expression dans les cellules iNKT et MAIT corrèle avec le phénotype pro-apoptotique de ces cellules. D'ailleurs, la surexpression de PLZF dans la lignée T Jurkat se traduit par une expression augmentée de la caspase 3 et de sa forme clivée, en accord avec l'expression augmentée de cette protéine et de sa forme clivée qui est observée dans les cellules iNKT et de caspases activées dans les cellules MAIT (figure 22). De plus la surexpression de PLZF dans cette même lignée s'accompagne aussi d'une augmentation de l'expression de XIAP similaire à celle observée dans les cellules iNKT. Nous avons également vu que les cellules T  $\gamma\delta$  humaines ont aussi un phénotype pro-apoptotique. De manière intéressante, une étude de 2011 a montré que ces cellules expriment aussi PLZF chez l'homme<sup>108</sup>. Cependant, l'expression semble beaucoup moins forte que dans les cellules

iNKT ou MAIT humaines. Cette différence d'expression pourrait ainsi expliquer que même si elles sont plus sensibles à l'apoptose que des cellules T  $\alpha\beta$  conventionnelles, les cellules T  $\gamma\delta$  sont moins sensibles que les cellules iNKT ou MAIT.

L'étude de certains modèles murins suggère également un rôle pro-apoptotique de PLZF dans les cellules iNKT. Ainsi, la souris transgénique pour PLZF dans les cellules T à une réduction de son nombre de cellules iNKT en périphérie, ce qui est en faveur d'un rôle pro-apoptotique de PLZF dans ces cellules. En s'intéressant au développement thymique des cellules iNKT, les auteurs ont montré qu'au stade 0, les cellules iNKT sont en nombre normal. Par contre, les cellules au stade 3 sont fortement diminuées dans le thymus<sup>107</sup>. L'étude de PLZF au cours du développement des cellules iNKT montre que l'expression de PLZF est présente au stade 0, augmente au stade 1 avant de fortement diminuer dans les stades 2 et 3<sup>106</sup>. On peut alors penser que dans le modèle de souris transgénique pour PLZF, qu'il n'y a pas de diminution de l'expression de PLZF lors du passage au stade 3, comme l'expression de PLZF est forcée par le transgène. Cette forte expression de PLZF pourrait alors s'accompagner d'une apoptose massive des cellules iNKT. De manière concordante, dans le modèle murin de déficience en ITK, les cellules iNKT sont plus apoptotiques que des cellules iNKT de souris sauvage, et ont des niveaux d'expression de PLZF plus importants<sup>454</sup>.

Par ailleurs, dans nos expériences, la surexpression de PLZF dans des cellules conventionnelles V $\beta$ 2 ne donne pas lieu à des apoptoses aussi importantes que celle des cellules iNKT. De la même manière, dans nos expériences d'extinction de PLZF dans les cellules iNKT ou les cellules MAIT, l'apoptose n'est que partiellement réduite. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que le niveau d'expression de PLZF obtenu dans les cellules T V $\beta$ 2 transduites est inférieur à celui que présentent naturellement les cellules iNKT, et que l'extinction de l'expression de PLZF dans les cellules iNKT ou MAIT n'est que très partielle. Par ailleurs, les études chez la souris montrent que PLZF est requis dans le thymus pour le développement et l'acquisition du phénotype effecteur des cellules iNKT<sup>106</sup>. Comme le montre la figure 19, PLZF est déjà exprimé dans les cellules mises en expansions à partir de cellules de thymus, et le caractère pro-apoptotique des cellules iNKT est déjà présent dans ces cellules. Ces données suggèrent que PLZF joue un rôle dans l'acquisition du caractère pro-apoptotique au niveau du thymus. Modifier l'expression de PLZF dans des cellules matures pourrait ainsi ne pas être suffisant pour modifier efficacement ce phénotype pro-apoptotique que ce soit dans les cellules V $\beta$ 2 ou dans les cellules iNKT.

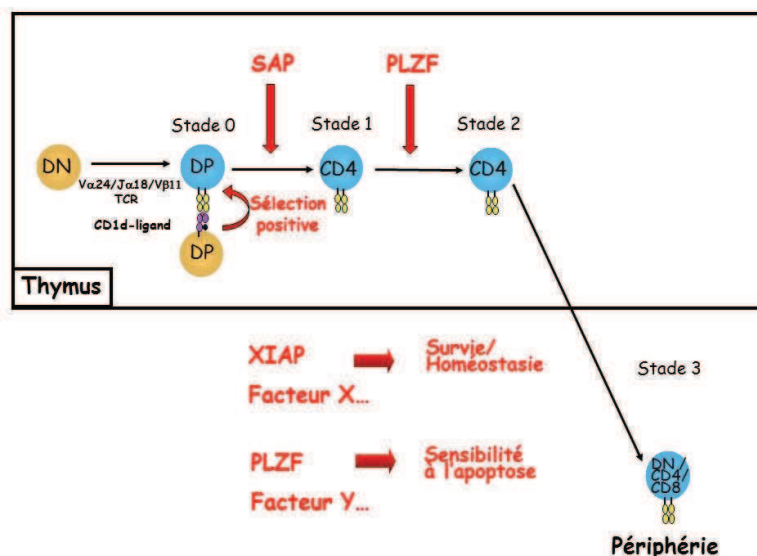


Enfin, le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT et MAIT pourrait aussi être sous le contrôle d'autres facteurs de transcriptions en combinaison ou non avec PLZF. Un argument en faveur de cette hypothèse est l'effet différent de l'expression de PLZF sur l'apoptose selon le type cellulaire étudié. Ainsi, une étude de 2007 a montré qu'une surexpression de PLZF conduit à une apoptose augmentée dans la lignée de cellules T Jurkat. Par contre, la surexpression de PLZF dans la lignée de précurseurs de granulocytes K562 ou dans la lignée lymphocytaire B DG-75<sup>431</sup> n'a pas d'effet sur l'apoptose. Paradoxalement, PLZF a aussi été montré par la même équipe comme se liant aussi à une région régulatrice de Bid dans les cellules Jurkat. PLZF réprime alors l'expression de Bid<sup>455</sup>. Dans la lignée murine myéloïde 32Dcl3, l'expression de PLZF joue également un rôle négatif dans le cycle cellulaire et augmente l'apoptose<sup>430</sup>. PLZF régule négativement la prolifération et le cycle cellulaire en se liant à la région régulatrice de c-Myc, réduisant ainsi son expression<sup>456</sup>. Enfin, PLZF joue un rôle anti-apoptotique nécessaire au maintien de la spermatogénèse<sup>450</sup>. La différence de comportement de PLZF vis-à-vis de l'apoptose dans différents types cellulaires pourrait ainsi indiquer que PLZF agit en coopération avec d'autres facteurs qui sont différents selon le type cellulaire considéré.

Il serait par ailleurs intéressant d'identifier les cibles transcriptionnelles de PLZF. En effet, si nous avons vu que la caspase 3 est surexprimée en présence de PLZF dans les Jurkat TAG, il est probable que le gène de la caspase 3 ne soit pas directement la cible de PLZF qui est plutôt un répresseur transcriptionnel. Il y a donc certainement des intermédiaires dans la régulation de l'expression de la caspase 3 par PLZF.

Sur la base de nos résultats et de ceux publiés dans la littérature, nous pouvons alors proposer le schéma suivant de développement et d'homéostasie des cellules iNKT humaines (figure 36). SAP et PLZF interviennent dans le développement thymique. XIAP serait nécessaire à la survie des cellules iNKT en périphérie. PLZF interviendrait lui aussi dans la régulation de ces cellules en leur conférant un phénotype pro-apoptotique. Par ailleurs, il existe certainement d'autres facteurs importants pour la régulation de l'homéostasie des cellules iNKT en périphérie. D'autres IAP pourraient ainsi avoir un rôle protecteur alors que d'autres facteurs de transcription pourraient participer à l'acquisition de cette susceptibilité à l'apoptose. Nous pouvons citer par exemple le facteur de transcription à doigt de zinc Hobit récemment identifié. Celui-ci est en effet nécessaire au développement et à la différenciation effectrice des cellules iNKT murines et pourrait aussi avoir un rôle dans leur survie en

périphérie comme le suggèrent des expériences de stimulation dans l'étude de Gisbergen et al.<sup>457</sup>. Néanmoins, le facteur Hobit n'est pas exprimé dans les cellules iNKT humaines.



**Figure 36 : Schéma récapitulatif du développement et de l'homéostasie des cellules iNKT humaines.** En plus des rôles connus de SAP et PLZF dans le développement des cellules iNKT, nos résultats montrent que XIAP et PLZF sont importants pour l'homéostasie de ces cellules. D'autres facteurs sont aussi certainement impliqués.

**D. PHÉNOTYPE DES CELLULES INKT RÉSIDUELLES CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE XLP-2 :**

L'étude des marqueurs CD161, CD4 et CD8 des cellules iNKT du patient P1 ne montre pas de défaut (figure 13). Comme pour les contrôles, la majorité des cellules CD3<sup>+</sup>Vα24<sup>+</sup>Vβ11<sup>+</sup> est aussi CD161<sup>+</sup>. Pour les patients XLP-2, le pourcentage est plus variable et chez deux des trois patients montrés, la majorité des cellules détectées par le marquage CD3<sup>+</sup>Vα24<sup>+</sup>Vβ11<sup>+</sup> est CD161<sup>-</sup> (figure 47, annexe 9). Les données sur le patient P1 excluent un défaut de développement des cellules iNKT chez les patients XLP-2, qui conduirait à une augmentation de la population CD161<sup>-</sup> chez eux. D'ailleurs, cette population de cellules iNKT CD161<sup>-</sup> est retrouvée de manière majoritaire chez des patients souffrant de la maladie de Crohn, qui est une pathologie inflammatoire chronique qui pourrait induire l'apoptose des cellules iNKT (données non publiées). Ces observations pourraient suggérer que la population de cellules iNKT CD161<sup>-</sup> est moins sensible à l'apoptose que la population CD161<sup>+</sup>, et qu'elle aurait donc un avantage sélectif chez les patients XLP-2 ou chez les patients souffrant de la maladie de Crohn. Une observation en faveur de cette hypothèse est la description en 2011 d'une population humaine de cellules Vα24<sup>-</sup> reconnaissant toutefois un tétramère de CD1d chargé en αGalCer. Ces cellules ont un phénotype naïf et n'expriment pas

CD161. De manière intéressante, ces cellules expriment des niveaux intermédiaires de PLZF<sup>458</sup>. Il est donc possible que les cellules iNKT CD161<sup>+</sup> expriment elles aussi des niveaux plus faibles de PLZF, provoquant une moindre sensibilité à l'apoptose. Un autre argument en faveur de cette hypothèse est le fait que chez la souris PLZF KO, les cellules iNKT qui se développent n'expriment pas ou peu NK1.1 (l'équivalent murin de CD161)<sup>105</sup>. Il serait donc intéressant de mesurer l'expression de PLZF dans les deux populations de cellules iNKT pour voir si il y a une différence selon que les cellules expriment ou non CD161, ou encore d'analyser l'effet de la diminution de PLZF sur l'expression de CD161. Enfin, il faudrait étudier l'apoptose de cellules iNKT résiduelles chez les patients XLP-2 pour voir si en effet elles sont plus résistantes à l'apoptose, ce que suggère l'ensemble de ces observations.

### **E. ROLE DES CELLULES iNKT DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DU XLP-2 :**

#### **1. Un lien entre EBV et NKT :**

L'ensemble de nos observations nous permet de proposer un modèle d'activation des cellules iNKT lors de l'infection de l'EBV : lors de la primo-infection par l'EBV, les cellules B vont augmenter l'expression de surface de CD1d comme le suggère le résultat de l'expérience d'activation des cellules B (figure 33). Il est probable que cette surexpression s'accompagne de l'exposition d'un ligand endogène des cellules iNKT, la nature de ce ligand restant à déterminer. Cette présentation d'un ligand par les cellules B infectées va permettre l'activation des cellules iNKT. D'une part, grâce à leur activité cytotoxique, elles vont pouvoir lyser les cellules B infectées, d'autre part, cette activation va s'accompagner d'une production de cytokines comme l'IFN- $\gamma$  qui va permettre la transactivation d'autres cellules du système immunitaire. Les cellules iNKT interviendraient donc dans la phase précoce de l'infection par l'EBV. Il est aussi vraisemblable qu'en plus de ce mécanisme potentiel direct d'activation des cellules iNKT par les cellules B infectées, il existe un mécanisme d'activation indirecte par des CPA. Il a en effet été montré que l'EBV est capable d'activer les cellules dendritiques via le TLR9<sup>459</sup>. Par ailleurs, une activation des cellules dendritiques via certains TLR a été montré comme entraînant une présentation accrue de glycosphingolipides par CD1d<sup>135</sup>. Dans cette étude, l'activation via le TLR-9 n'a cependant pas été étudiée. Enfin, les cellules iNKT pourraient avoir également un rôle dans la contraction de la réponse anti-EBV. En effet, une étude de Ho et al. en 2004<sup>165</sup> a montré que des cellules iNKT sont capables de limiter l'expansion de cellules T activées spécifiques de l'EBV en lysant soit des CPA soit des cellules T exprimant CD1d. Une mauvaise contraction

de la réponse anti-EBV à cause de la réduction du nombre de cellules iNKT pourrait donc aussi participer à la physiopathologie du XLP, dont le déclenchement du HLH qui se caractérise par une réponse exacerbée non contrôlée.

L'hypothèse d'un rôle des cellules iNKT dans le contrôle de l'EBV est aussi appuyée par le fait que la vaccination contre un virus de la même famille, le VZV, a déclenché une varicelle sévère chez deux patients qui ne présentaient pas d'autres anomalies qu'un nombre réduit de cellules iNKT<sup>204,205</sup>. Un autre argument est l'existence de mécanismes d'échappement développés par des membres de la famille des herpesvirus dont fait partie l'EBV. Ainsi, l'HHV-8 utilise les protéines MIR1 et MIR2 pour réguler l'expression de CD1d à la surface des cellules infectées. Cette inhibition est due à une ubiquitination de la chaîne  $\alpha$  de CD1d sur la partie cytoplasmique qui entraîne l'endocytose du récepteur<sup>214</sup>. De plus, Yuan et al. ont montré qu'HSV-1 réduit l'expression de CD1d à la surface des cellules dendritiques en interférant avec le recyclage de la molécule CD1d<sup>215</sup>. Nos observations suggèrent elles aussi que l'EBV a la capacité de limiter l'expression de CD1d à la surface des cellules comme le montre l'absence d'expression ou l'expression très faible de CD1d à la surface des lignées B/EBV<sup>+</sup> (figure 35). Ce mécanisme d'échappement semble indiquer un rôle des cellules iNKT dans l'immunité anti-EBV. Afin de compléter ces données, nous pourrions étudier la possible modulation de l'expression de CD1d par l'EBV en utilisant un EBV modifié contenant le gène de la GFP dans son génome. En infectant des PBL d'un contrôle, nous serions alors capables de suivre l'expression de CD1d sur les cellules infectées. Il serait aussi possible de voir si des cellules B infectées par l'EBV sont capables d'activer des cellules iNKT.

Enfin, certaines observations au cours de pathologies associées à l'EBV plaident en faveur d'un rôle des cellules iNKT dans le contrôle des cellules infectées par l'EBV. Chez l'homme, une étude a montré que le nombre total de cellules iNKT est inférieur chez les patients souffrant de pathologies associées à l'EBV comme la maladie de Hodgkin ou la mononucléose infectieuse en comparaison avec des porteurs sains<sup>206</sup>. Même si cette étude a été rétractée, une autre étude a montré que la fréquence de cellules iNKT CD8<sup>+</sup> est diminuée dans le sang de patients souffrant de pathologies associées à l'EBV comme la maladie de Hodgkin ou le carcinome du nasopharynx<sup>207</sup>. L'étude des DIP apporte aussi des arguments en faveur d'un rôle des cellules iNKT vis-à-vis de l'infection par l'EBV. En effet, si la susceptibilité aux herpesvirus est classique au cours de déficits immunitaires avec un déficit T important, il existe également des déficits au cours desquels la susceptibilité est

particulièrement marquée vis-à-vis de l'EBV. C'est le cas par exemple du déficit en WASP<sup>124</sup>, en Cernunnos (données non publiées), ou encore du déficit en Munc 18.2 (aussi appelé FHL5)<sup>460</sup> au cours desquels il existe une diminution importante du nombre de cellules iNKT. Enfin, le syndrome XLP et le déficit en ITK sont particuliers par la susceptibilité élective vis-à-vis de l'infection par l'EBV, et sont caractérisés par une diminution très marquée du nombre de cellules iNKT<sup>102</sup>.

Cependant, pour certains déficits comme le FHL-5 la disparition des cellules iNKT pourrait précéder la pathologie ou être induite par celle-ci. Les cytokines inflammatoires qui s'accumulent dans le contexte du HLH pourraient en effet favoriser l'apoptose des cellules iNKT comme le suggèrent des observations récentes de la diminution des cellules iNKT chez des patients ayant un HLH<sup>460</sup>. Il faut aussi noter que toutes ces pathologies sont également associées à d'autres dysfonctionnements du système immunitaire qui pourraient aussi participer à la mauvaise réponse contre l'EBV. Par exemple, dans le cas du XLP-1, le rôle de SAP dans la réponse cytotoxique des lymphocytes T envers les cellules B infectées par l'EBV joue un rôle essentiel dans la pathogénie de la maladie. Dans le cas du XLP-2, nous ne pouvons exclure qu'une autre population importante pour le contrôle de l'infection par l'EBV, et que nous n'avons pas encore identifié à ce jour, soit également touchée par l'absence de XIAP.

## **2. Rôle de la susceptibilité à l'apoptose des cellules iNKT dans la physiopathologie du XLP-2 :**

Sur la base de ces observations et des propriétés connues des cellules iNKT (activation rapide et initiation de la réponse immunitaire), on peut donc proposer que ces cellules jouent un rôle important dans la réponse immunitaire contre l'EBV et plus particulièrement dans la phase initiale de cette réponse.

Chez les patients XLP-1, le contrôle précoce de l'infection se ferait donc mal en l'absence des cellules iNKT qui ne se développent pas. Chez les patients XLP-2, nous pouvons émettre l'hypothèse au vu des différentes expériences présentées dans ce manuscrit que les cellules iNKT sont présentes avant l'infection par l'EBV. Le patient P1 de la figure 11 a en effet un nombre normal de cellules iNKT qui semblent avoir un développement normal (figure 13). Dans la cohorte américaine, un autre patient XLP-2 ayant un nombre élevé de cellules iNKT a aussi été décrit et il est également séronégatif pour l'EBV<sup>461</sup>.

Lors de l'infection, les cellules iNKT des patients XLP-2 vont s'activer et répondre à l'infection comme chez des donneurs sains. Cette activation va entraîner leur apoptose, de manière similaire à ce qui se passe chez des contrôles. En l'absence de XIAP, la phase d'apoptose des cellules iNKT est cependant accentuée comme le montrent nos expériences d'extinction de XIAP. Cette apoptose accrue conduit alors à une forte diminution des cellules iNKT et donc à un mauvais contrôle de la phase précoce de l'infection comme dans le cas du XLP-1.

Les patients XLP-2 perdraient donc leurs cellules iNKT lors de la primo-infection par l'EBV. Par ailleurs, la majorité des cellules infectées par l'EBV est éliminée au cours de la réponse immunitaire, cependant quelques cellules B vont survivre et acquérir un phénotype mémoire à longue durée de vie. Ces cellules vont constituer un réservoir pour le virus. Cette phase dite de latence permet au virus de se maintenir dans les cellules de l'hôte de manière silencieuse. De manière sporadique, des événements physiologiques comme une stimulation antigénique peuvent déclencher une réactivation du virus qui va rentrer en phase dite lytique<sup>433</sup>. Cette phase latente d'infection permettrait elle d'expliquer que les patients XLP-2 ne retrouvent pas un nombre normal de cellules iNKT après la primo-infection, puisque leurs cellules iNKT sont stimulées de manière chronique par les cellules infectées. Cette hypothèse de disparition des cellules iNKT lors de la primo-infection par l'EBV et la stimulation chronique des cellules résiduelles pourrait aussi être à l'origine de l'apparition des cellules iNKT CD161<sup>-</sup> décrites dans la figure 47 chez les patients XLP-2. En effet, les patients montrés sur cette figure ont tous déjà été infectés par l'EBV. Les cellules iNKT CD161<sup>-</sup> auraient alors un avantage sélectif du fait de leur moindre sensibilité à l'apoptose.

Par ailleurs, l'expression de XIAP dans les cellules iNKT de deux mères porteuses de mutations nulles de XIAP a été mesurée par cytométrie dans une étude de 2009<sup>462</sup>. Chez une mère, la totalité des cellules iNKT sont XIAP<sup>+</sup> ce qui indique un biais dans l'inactivation du chromosome X dans cette population. Par contre, l'autre mère présente une population bimodale XIAP<sup>+</sup> et XIAP<sup>-</sup> dans ses cellules iNKT. Les auteurs en concluent que XIAP n'est nécessaire ni au développement ni à la survie des cellules iNKT. Ces observations sont néanmoins compatibles avec nos hypothèses. En effet, dans cette étude, le statut de l'infection par l'EBV des mères n'est pas donné. Nous pouvons donc imaginer que la mère ayant une population bimodale n'a pas encore rencontré l'EBV. Ses cellules iNKT XIAP<sup>+</sup> n'ont donc pas d'avantage sélectif. Par contre, la mère ayant des cellules iNKT uniquement XIAP<sup>+</sup> a

peut-être déjà été infectée par l'EBV. Ses cellules iNKT sont donc toutes XIAP<sup>+</sup> car ces dernières ont un avantage sélectif.

L'absence ou la fragilité des cellules iNKT favoriserait le déclenchement du syndrome lymphoprolifératif lors de l'infection par l'EBV. L'activité cytotoxique des cellules iNKT dans l'élimination des lymphocytes B infectées lors de la phase initiale de l'infection jouerait un rôle important dans le contrôle précoce de l'infection avant que l'immunité adaptative se mette en place avec l'apparition de cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques spécifiques de l'EBV.

En outre, il est aussi envisageable que d'autres virus puissent aussi résulter en une réduction du nombre de cellules iNKT chez les patients XLP-2, ce qui par la suite pourrait entraîner un mauvais contrôle de l'EBV. Enfin, nous ne pouvons exclure que le contexte inflammatoire du HLH puisse aussi participer à la perte des cellules iNKT chez les patients XLP-2 sans lien direct avec l'EBV.

#### **F. RÔLE DE LA SUSCEPTIBILITÉ À L'APOPTOSE DES CELLULES MAIT DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DU XLP-2 :**

Ce travail a aussi permis d'identifier le XLP-2 comme le premier DIP associé à un défaut de cellules MAIT en périphérie. Contrairement aux cellules iNKT pour lesquelles il semble nécessaire d'avoir un événement particulier comme l'infection par l'EBV, il semblerait que la réduction du nombre de cellules MAIT chez les patients XLP-2 soit générale. Le patient XLP-2 P1 qui n'a pas été infecté par l'EBV et qui a un nombre normal de cellules iNKT a lui aussi un nombre faible de cellules MAIT. On peut alors penser que les cellules MAIT, activées de manière chronique et précoce au cours de la vie par la flore bactérienne intestinale, meurent plus fortement en l'absence de XIAP. Par ailleurs, ces cellules semblent être un acteur de choix dans l'immunité intestinale puisqu'elles ont une capacité régulatrice, qu'elles sont activées par des bactéries et qu'elles sont enrichies dans la lamina propria intestinale<sup>239</sup>. Il est donc possible que la diminution des cellules MAIT, dans le sang mais également dans le tissu intestinal (données en cours de publication par Claire Aguilar) participe à la survenue des manifestations digestives inflammatoires observées chez environ 25% des patients atteints de XLP-2.

Par ailleurs, il serait également intéressant d'étudier le rôle des cellules iNKT dans ces manifestations digestives, du fait de leur rôle dans la production de cytokines importantes dans l'immunité muqueuse telles que l'IL-17 et l'IL-22, ou encore de leur interaction avec la flore intestinale<sup>60,463,464</sup>. Cependant, l'absence de pathologie intestinale inflammatoire évidente chez les patients atteints de XLP-1 plaide contre un rôle non redondant des cellules



iNKT dans l'immunité intestinale bien que les lymphomes retrouvés chez les patients XLP-1 ont surtout une localisation digestive<sup>347</sup>.

#### **G. LIMITES DES MÉTHODES UTILISÉES :**

Pour notre étude portant sur les cellules iNKT humaines, nous avons utilisé des méthodes d'expansions, puisque la proportion de ces cellules dans le sang périphériques de contrôles est très faible. Nous avons également mis en expansion des cellules T conventionnelles (les cellules T portant le réarrangement V $\beta$ 2). Ces méthodes d'expansions peuvent introduire des biais dans la réponse à des stimuli apoptotiques. Néanmoins, nous avons contrôlé ce système en comparant des marqueurs d'activation. De plus, nous avons aussi réalisé des expériences *ex vivo* pour nous assurer que le phénotype pro-apoptotique n'est pas uniquement dû à l'expansion.

Nous avons également utilisé des approches d'extinction d'expression par sh-RNA. Cette approche présente la limite de ne pas offrir une extinction complète de la protéine visée (XIAP ou PLZF dans notre cas). Une méthode alternative aurait été l'utilisation de souris XIAP KO. D'ailleurs, la très grande majorité des études sur les cellules iNKT sont faites chez la souris. Il existe en effet de nombreux modèles de souris transgéniques utiles pour l'étude de ces cellules. De plus, le nombre relativement important de lymphocytes iNKT chez la souris permet de les étudier facilement.

Néanmoins, même si le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT est aussi retrouvé chez la souris, le rôle de XIAP ne semble pas équivalent dans les deux espèces (figure 31). L'utilisation de la souris XIAP KO n'a donc pas permis d'appréhender le rôle de XIAP pour les cellules iNKT. Par ailleurs, l'utilisation de souris KO pour étudier le rôle de PLZF en périphérie n'est pas possible puisque PLZF est requis pour le développement de ces cellules<sup>105,106</sup>. Il pourrait être utile d'utiliser une souris KO conditionnel qui permettrait d'éteindre l'expression de PLZF dans les cellules iNKT en périphérie.

#### **IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES :**

##### **A. CONCLUSION :**

Ce travail de thèse a permis de montrer que les cellules T innées iNKT et MAIT humaines partagent un phénotype pro-apoptotique qui n'est pas retrouvé dans des cellules T conventionnelles. La forte expression dans ces cellules de molécules impliquées dans l'apoptose comme les caspases et leurs formes clivées rend compte de ce phénotype pro-apoptotique. Celui-ci corrèle avec un rôle important de XIAP dans l'homéostasie de ces cellules. XIAP pourrait ainsi être particulièrement requis par les cellules iNKT et MAIT pour contrer l'effet des caspases. Cette dépendance particulière en XIAP se traduit par une réduction de ces cellules dans le sang des patients XLP-2. Cette pathologie constitue donc le premier DIP associé à une réduction du nombre de cellules MAIT en périphérie. De manière intéressante, ce déficit en cellules MAIT pourrait participer à la physiopathologie du XLP-2 pour lequel une atteinte intestinale est observée chez 25% des patients. Dans le cas des cellules iNKT, ce phénotype pro-apoptotique est acquis de manière précoce puisque l'étude de cellules iNKT de thymus ou de sang de cordon montre qu'elles ont déjà un phénotype pro-apoptotique. Par ailleurs, nous avons aussi montré que les cellules T  $\gamma\delta$  sont également plus sensibles à l'apoptose que des cellules T conventionnelles  $\alpha\beta$ . Néanmoins ce phénotype est moins marqué que pour les cellules iNKT et MAIT et ne semble pas aussi dépendant de XIAP. Enfin, le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT est aussi observé chez la souris bien que celui-ci ne soit pas régulé par XIAP.

De plus, notre étude montre que le phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT est en partie dépendant de l'expression du facteur de transcription PLZF. En effet, des expériences d'extinction de PLZF dans les lymphocytes iNKT et MAIT ou des expériences de surexpression de PLZF dans des cellules T conventionnelles montrent que PLZF contrôle en partie le phénotype pro-apoptotique des cellules T innées. Il joue notamment un rôle dans la plus forte expression de la caspase 3 dans les cellules T innées comme le montrent des études biochimiques dans les cellules T Jurkat surexprimant PLZF.

L'ensemble de ces travaux a donc permis de mettre en évidence un mécanisme de régulation qui permettrait de limiter l'intensité de la réponse des cellules iNKT et MAIT. Il est en effet nécessaire de pouvoir contrôler ces cellules au phénotype activé/mémoire pour éviter un emballement de la réponse immunitaire qui aurait un effet délétère sur l'organisme. De plus, ces cellules sont activées plus facilement et de manière moins spécifique que les populations de

lymphocytes T conventionnelles de par les ligands qu'elles reconnaissent. Leur grande sensibilité à l'apoptose agirait lors de leur activation afin de limiter leur expansion et la durée de leur réponse. De manière remarquable, le facteur de transcription PLZF qui est en partie responsable du caractère inné de ces cellules est aussi impliqué dans l'établissement de leur phénotype pro-apoptotique. PLZF est donc un facteur clé pour la différenciation et l'homéostasie de ces cellules innées en régulant l'acquisition des fonctions effectrices et en limitant leur survie. La protéine XIAP participerait elle dans ce contexte à contrer dans une certaine mesure la plus grande expression de caspases, ce qui permettrait aux cellules de survivre en périphérie en l'absence de stimulation. XIAP pourrait aussi agir en combinaison d'autres facteurs tel l'IL-15 qui est spécifiquement requis pour la survie de ces cellules en périphérie<sup>112</sup>.

L'identification d'un phénotype pro-apoptotique restreint aux cellules iNKT et MAIT, qui dépend de PLZF et qui est contrebalancé par XIAP apporte de nouvelles connaissances sur la biologie de ces cellules.

Nos résultats préliminaires indiquent enfin que les cellules iNKT pourraient jouer un rôle dans la réponse à l'infection par l'EBV. En effet, nous avons montré qu'une activation des cellules B se traduit par une augmentation de l'expression de surface de CD1d. De plus, l'étude de lignées B semble indiquer que l'EBV est capable d'interférer avec cette expression. Par ailleurs, l'existence du patient XLP-2 P1 qui a un nombre normal de cellules iNKT et qui n'a pas encore été infecté par l'EBV suggère que la perte des cellules iNKT est secondaire à l'infection chez les patients XLP-2. Cette perte pourrait être due à une activation directe ou indirecte des cellules iNKT par des cellules B infectées.

## **B. PERSPECTIVES :**

### **1. Mise en évidence du rôle des cellules iNKT dans l'infection par l'EBV :**

Il serait intéressant d'étudier d'autres pathologies induites par l'EBV et d'analyser le compartiment iNKT chez les patients. On peut notamment s'intéresser au cas des *Post-transplantation lymphoproliferative disorders* (PTLD). Les PTLD sont des lymphoproliférations B/EBV qui surviennent chez des patients transplantés et sous immunosuppresseurs<sup>465</sup>. Nous pouvons aussi étudier les lymphomes de hodgkin survenant chez les patients HIV et qui sont toujours associés à l'EBV alors même que le plus souvent ces patients n'ont pas de lymphopénie T sévère<sup>466</sup>. Il serait alors possible de chercher une

corrélation entre le nombre de cellules iNKT circulantes et l'apparition de PTLD ou de lymphomes chez les patient HIV.

Enfin, une dernière approche qui serait un argument fort en faveur d'un rôle des cellules iNKT contre l'infection par l'EBV serait la découverte de cellules iNKT « révertantes » dans le contexte des DIP. Il a en effet été décrit en 2012 les cas de 8 patients déficients en SAP chez qui il a été trouvé des cellules T CD8<sup>+</sup> (et des cellules NK chez un des patients) ayant subi une réversion de la mutation originale leur permettant d'exprimer une protéine sauvage<sup>467</sup>. Ces événements de réversion ne se produisent que chez des patients ayant été infectés par l'EBV ce qui suggère que celui-ci exerce une pression de sélection suffisante pour faire apparaître ces cellules T, d'autant plus que les cellules révertantes reconnaissent des cellules B/EBV. Dans cette étude il n'a cependant pas été observé de patients ayant retrouvé des cellules iNKT dans le sang, ce qui aurait indiqué un événement de réversion permettant le développement des lymphocytes iNKT. Il serait cependant intéressant de chercher des cellules iNKT ayant subi un événement de réversion parmi les cellules de patients XLP-1, XLP-2 ou d'autres DIP caractérisé par une susceptibilité à l'EBV. Cette identification aurait d'autant plus de sens si elle était associée à un contrôle de l'EBV chez le patient.

## **2. Les cellules iNKT comme biomarqueur :**

La démonstration du caractère pro-apoptotique des cellules iNKT donne une explication au défaut de ces cellules observé dans de nombreuses pathologies chez l'homme comme l'auto-immunité, les pathologies inflammatoires, les cancers et les infections (cf. introduction). Dans de telles situations, le défaut de cellules iNKT pourrait être secondaire au contexte pathologique qui augmenterait l'apoptose des cellules iNKT. Par exemple, les patients obèses souffrent d'inflammation chronique<sup>468</sup> et le nombre de cellules iNKT dans leur omentum (organe particulièrement riche en cellules iNKT) est diminué<sup>30</sup>. Il est donc possible que le nombre de cellules iNKT soit un bon marqueur biologique corrélant avec l'évolutivité de certaines maladies.

Si le lien entre EBV et cellules iNKT est confirmé, il serait aussi utile de se servir des cellules iNKT dans des pathologies associées à l'EBV. Cela permettrait d'adapter le suivi des patients. En effet, Il pourrait être utile d'anticiper les événements liés à l'EBV comme les PTLD ou la survenue de lymphomes de Hodgkin chez les patients VIH, en se servant des cellules iNKT comme facteur pronostic de la survenue de ces pathologies. Selon leur nombre

de cellules iNKT, les patients pourraient être ainsi classés dans des groupes à risques qui nécessiteraient un suivi plus ou moins rapproché. Néanmoins cette approche nécessiterait un bon suivi des patients car comme on l'a vu, il existe une grande variabilité interindividuelle du nombre de lymphocytes iNKT.

### **3. Utilisation thérapeutique des cellules iNKT :**

Par ailleurs, les cellules iNKT ayant un haut potentiel anti-tumoral, il est tentant de vouloir les utiliser comme approche thérapeutique. Nous pouvons en effet imaginer qu'un patient atteint d'une tumeur a un nombre réduit de cellules iNKT du fait d'une apoptose élevée de ces dernières dans le contexte pathologique. Un moyen de contourner cette disparition des cellules iNKT par apoptose est d'amplifier *ex vivo* des cellules iNKT du patient avant de lui réinjecter. Cet apport artificiel de cellules iNKT pourrait ainsi permettre d'avoir un effet anti-tumoral sans recourir à des traitements plus lourds comme une chimiothérapie ou une greffe. Des essais cliniques utilisant cette stratégie ont été tentés et l'innocuité de cette approche a été démontrée<sup>469</sup>. Si dans cet essai aucun patient n'a eu d'amélioration de sa maladie, un deuxième essai couplant l'injection de cellules iNKT mises en expansion *in vitro* avec l'injection de CPA chargées en  $\alpha$ GalCer a permis d'observer des améliorations chez les patients<sup>470</sup>. Il semble donc qu'il soit nécessaire dans ce genre d'approches de stimuler les cellules iNKT pour avoir un bénéfice thérapeutique.

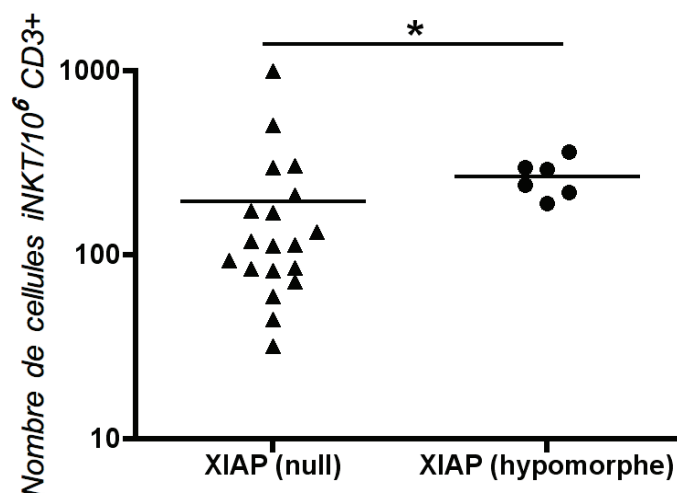
De plus, une étude prospective chez des enfants ayant reçu une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques suite à une leucémie ou une myélodysplasie a été effectuée par de Lalla et al.<sup>189</sup>. Celle-ci montre une forte corrélation entre l'absence de rechute et la reconstitution d'un pool de cellules iNKT du donneur chez l'hôte. Une autre étude publiée en 2012 a montré que cette reconstitution est associée à une meilleure survie et à une incidence moindre de rejet du greffon contre l'hôte<sup>471</sup>. De la même manière, le nombre de cellules iNKT avant traitement de patients souffrant de leucémie myéloïdes aigues a été corrélé à une meilleure survie<sup>472</sup>. Il semble donc que le nombre de cellules iNKT avant traitement ou le nombre de cellules iNKT reconstituées après une greffe corrèle avec un bon pronostic. Il est certes difficile de dire si les cellules iNKT sont plus nombreuses puisque la maladie régresse ou si la maladie régresse parce que les cellules iNKT sont plus nombreuses. Il pourrait néanmoins être intéressant de traiter les patients avant chimiothérapie ou les patients n'ayant pas reconstitué un pool de cellules iNKT dans un laps de temps court suite à une greffe avec des injections de cellules iNKT mises en expansions *in vitro* à partir des cellules du donneur.

Par ailleurs, dans le cas du XLP-2, il est envisageable de palier au déficit de cellules iNKT chez les patients en utilisant une approche d'injections de cellules iNKT mises en expansion *in vitro* dès lors que les patients font la primo-infection à l'EBV. Par cette stratégie, on ne pourra pas agir aux étapes précoces de l'infection, mais l'apport de cellules iNKT pourrait cependant permettre de participer à la contraction de la réponse anti-EBV, ce qui permettrait de limiter la lymphoprolifération dans le temps. Il est aussi envisageable d'utiliser des médicaments permettant d'augmenter le nombre de cellules iNKT comme le lénalidomide qui est capable *in vivo* d'augmenter le nombre de cellules iNKT chez des patients souffrant de myélomes<sup>473</sup>.

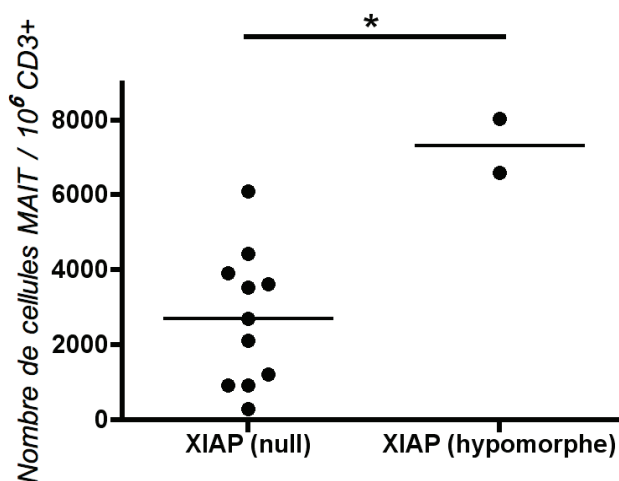
Enfin, même s'il pourrait sembler au premier abord imprudent d'injecter une grande quantité de cellules iNKT à une personne ou de les amplifier *in vivo*, à cause de leur grande réactivité et de leur capacité à produire de grandes quantités de cytokines, il est raisonnable de penser que leur phénotype pro-apoptotique entraînera leur élimination naturelle en cas de trop forte activation. Il s'agirait donc d'un médicament «à durée de vie limitée».

## V. ANNEXES :

### A. ANNEXE 1: LES PATIENTS XLP-2 HYPOMORPHES ONT PLUS DE CELLULES iNKT ET MAIT QUE LES PATIENTS N'AYANT PAS DE PROTEINE RESIDUELLE :



**Figure 37 : Les patients hypomorphes ont plus de cellules iNKT que les patients n'exprimant pas de protéine résiduelle.** Comparaison du nombre de cellules iNKT (TCRV $\alpha$ 24<sup>+</sup>TCRV $\beta$ 11<sup>+</sup>) dans les lymphocytes CD3<sup>+</sup> du sang de patients n'ayant pas de protéine XIAP (null) et de patients hypomorphes (hypomorphe). Les cellules iNKT ont été détectées par marquage par un anti-CD3, un anti-V $\alpha$ 24 et un anti-V $\beta$ 11. \*P<0.05

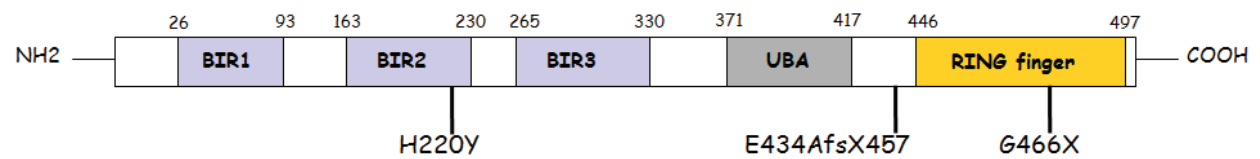


**Figure 38 : Les patients hypomorphes ont plus de cellules MAIT que les patients n'exprimant pas de protéine résiduelle.** Comparaison du nombre de cellules MAIT (TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>) dans les lymphocytes CD3<sup>+</sup> du sang de patients n'ayant pas de protéine XIAP (null) et de patients hypomorphes (hypomorphe). Les cellules MAIT ont été détectées par marquage par un anti-CD3, un anti-V $\alpha$ 7.2 et un anti-CD161. \*P<0.05



Patient	Mutation	Nombre de cellules iNKT	Nombre de cellules MAIT
1	G466X	218	
2	G466X	299	
3	G466X	293	
4	G466X	363	
5	E434AfsX457	190	6600
6	H220Y	239	8030

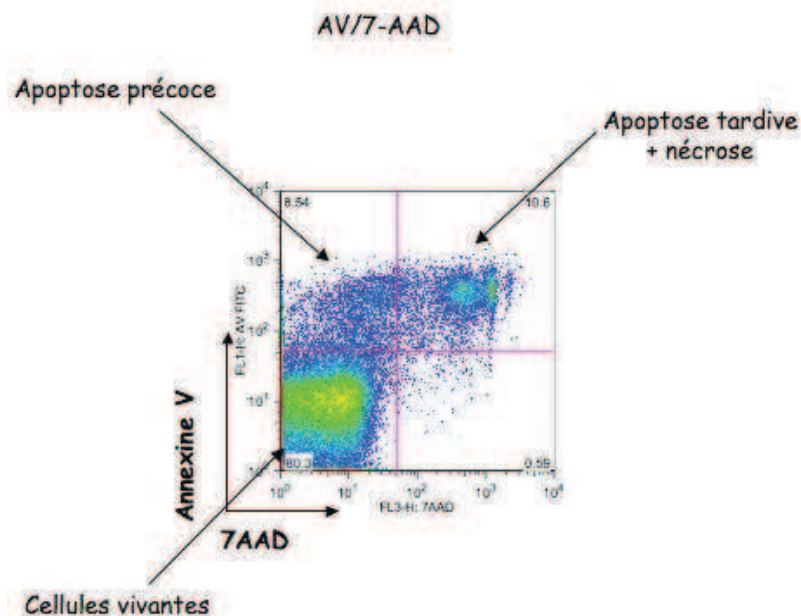
**Tableau 4 : Mutations et nombre de cellules iNKT et MAIT associés aux patients XLP-2 hypomorphes.** Le nombre de cellules iNKT et cellules MAIT est donné pour  $10^6$  cellules T CD3<sup>+</sup>.



**Figure 39 : Représentation schématique de la protéine XIAP.** Les différents domaines de la protéine XIAP ont été représentés. Les chiffres indiqués correspondent à la position des domaines en fonction de la séquence en acides aminés. Sous la protéine sont indiquées les mutations hypomorphes de notre cohorte.

## B. ANNEXE 2 : METHODE DE MESURE DE L'APOPTOSE :

L'annexineV permet de marquer les phosphatidylsérines qui sont exposées à la surface des cellules suite à l'entrée en apoptose des cellules. Le 7-AAD est un intercalant de l'ADN qui ne pénètre dans la cellule que si celle-ci est perméabilisée. L'exposition des phosphatidylsérines étant un des premiers événements intervenant lors de l'apoptose, nous pouvons identifier 3 états apoptotiques selon le double marquage en annexineV et en 7-AAD comme indiqué sur la figure 40<sup>474</sup>.

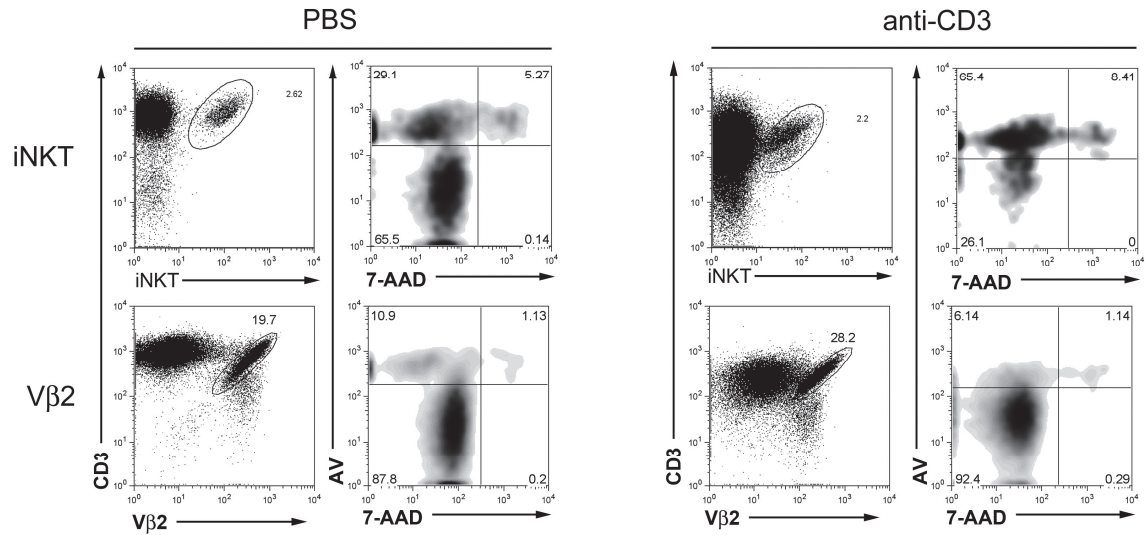


**Figure 40 : Méthode d'évaluation de l'apoptose cellulaire.** Les cellules sont d'abord marquées par des anticorps extracellulaires, puis par de l'annexine V et du 7-AAD.

Nous avons choisi de considérer dans la suite pour le calcul des apoptoses induites les cellules en apoptose précoce pour ne pas inclure les cellules nécrotiques. Pour le calcul de l'apoptose induite, nous avons utilisé la formule suivante :

$$\% \text{ apoptose induite} = 100 \times \frac{(\% \text{ apoptose mesurée suite à la stimulation} - \% \text{ apoptose spontanée})}{100 - \% \text{ apoptose spontanée}}$$

La figure ci-dessous est un exemple de figures de FACS obtenues lors d'une stimulation par CD3 d'expansions de cellules iNKT et Vβ2.



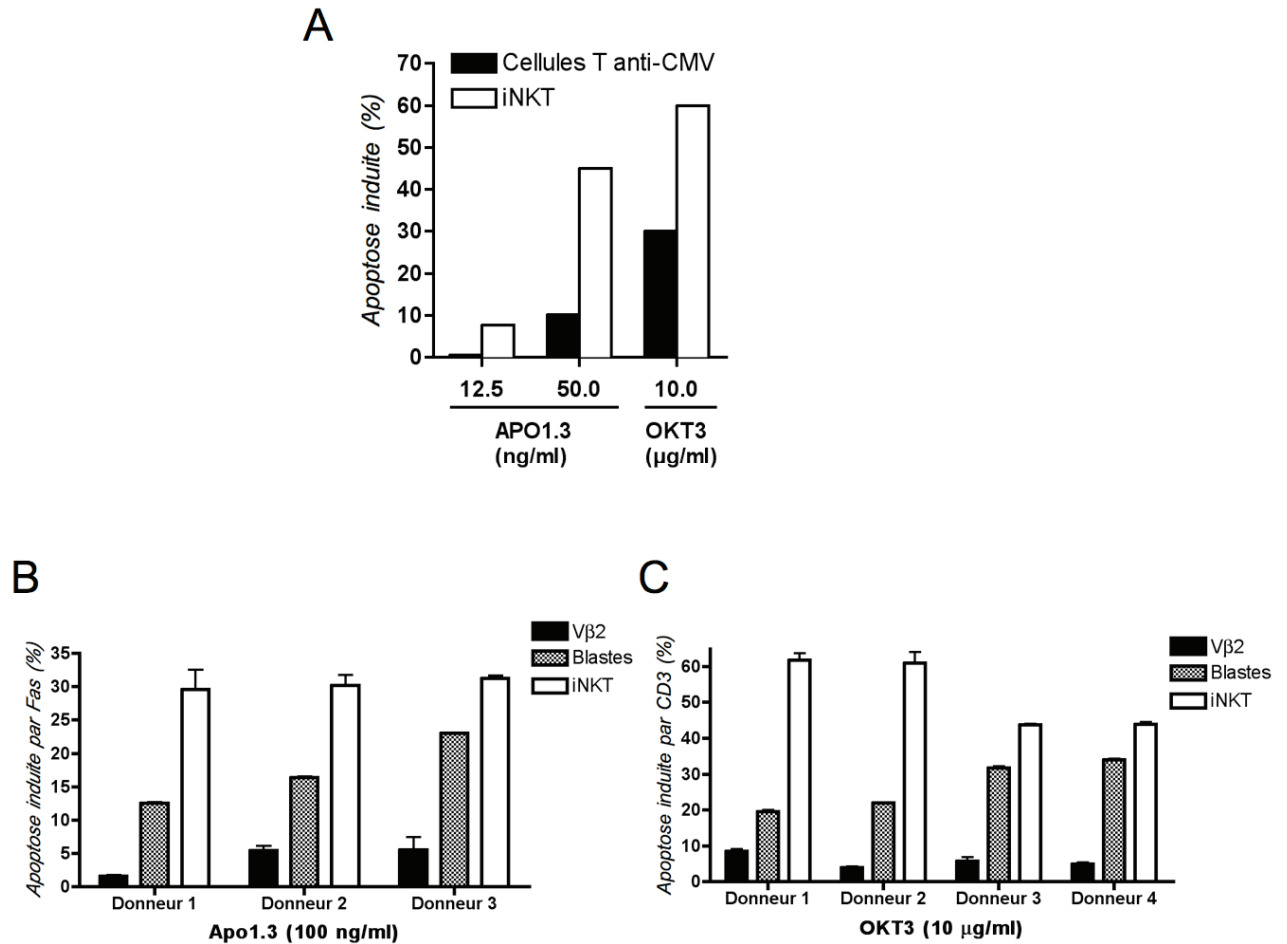
**Figure 41 : Figures représentatives de FACS montrant la stratégie utilisée pour la détection de l'apoptose.** Des expansions de cellules iNKT et Vβ2 d'un même contrôle ont été stimulées avec un anti-CD3 (10 mg/ml) pendant 18h. L'apoptose des cellules iNKT et Vβ2 a été mesurée par marquage avec de l'annexine V et du 7-AAD après avoir sélectionné les cellules CD3<sup>+</sup>TCR-iNKT<sup>+</sup> et les cellules CD3<sup>+</sup>TCR-Vβ2<sup>+</sup> respectivement.

**C. ANNEXE 3 : CARACTERISTIQUES DES CONTROLES UTILISES :**

Donneurs sains	iNKT/10 <sup>6</sup> CD3+	Vβ2 (%CD3+)	Age (années)
#1	2800	8,5	inconnu
#2	840	7,7	inconnu
#3	7200	inconnu	33
#4	3610	8	47
#5	1200	4,1	45
#6	4400	4	33
#7	587	8,7	24
#8	30	7,2	28
#9	4680	7	29
#10	710	8,3	inconnu
#11	inconnu	inconnu	inconnu
#12	18600	6,7	31
#13	3060	inconnu	33
#14	474	9,5	38
#15	400	inconnu	29
#16	2930	6	41
#17	375	inconnu	31
#18	630	10,6	inconnu
#19	inconnu	inconnu	inconnu
#20	710	8,4	inconnu
#21	inconnu	inconnu	55
#22	inconnu	inconnu	59

**Tableau 5 : Caractéristiques des donneurs testés dans l'étude.** Les caractéristiques des donneurs sains ayant été utilisés dans cette étude ont été rassemblées dans cette table.

**D. ANNEXE 4 : LES CELLULES iNKT SONT PLUS SENSIBLES A L'APOPTOSE QUE LES CELLULES T CONVENTIONNELLES :**



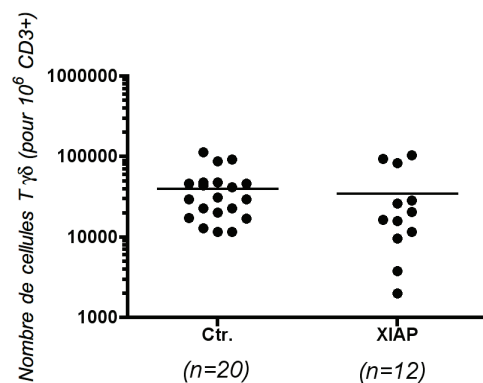
**Figure 42 : L'apoptose de cellules iNKT est supérieure à celle de cellules CD8<sup>+</sup> spécifiques du CMV ou de blastes PHA.** (A) Des cellules iNKT ou des cellules CD8<sup>+</sup> spécifiques du CMV issues d'expansions ont été stimulées par un anti-Fas soluble ou par un anti-CD3. Les données sont représentatives de trois expériences indépendantes. Des cellules iNKT, des cellules Vβ2 et des blastes PHA issues d'expansions de trois contrôles ont été stimulées par un anti-Fas soluble (B) ou par un anti-CD3 (C). Les barres d'erreur représentent des duplicats d'expérience.

**E. ANNEXE 5 : SUREXPRESSION DE PROTEINES PRO-APOPTOTIQUES DANS LES CELLULES iNKT :**

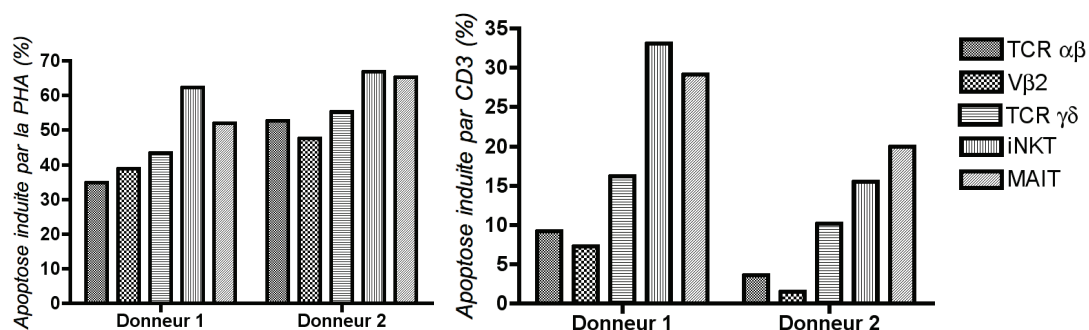
	# 4	# 6	# 9
CASP7	1,91	1,43	1,81
CASP3	1,43	1,51	1,23
CASP3 clivée	1,76	1,54	2,00
XIAP	1,24	1,15	
BID	1,64	1,37	1,24

**Tableau 6 : Quantification de la surexpression de protéines pro-apoptotiques dans les cellules iNKT.** Le tableau donne pour chaque donneur utilisé le coefficient de surexpression des protéines pro-apoptotiques dans les cellules iNKT par rapport aux cellules V $\beta$ 2. La quantification a été faite à l'aide du logiciel ImageJ (NIH) en se servant de Ku70 pour normaliser les données.

**F. ANNEXE 6 : LES PATIENTS XLP-2 N'ONT PAS DE DIMINUTION DU NOMBRE DE LEURS CELLULES T  $\gamma\delta$  :**



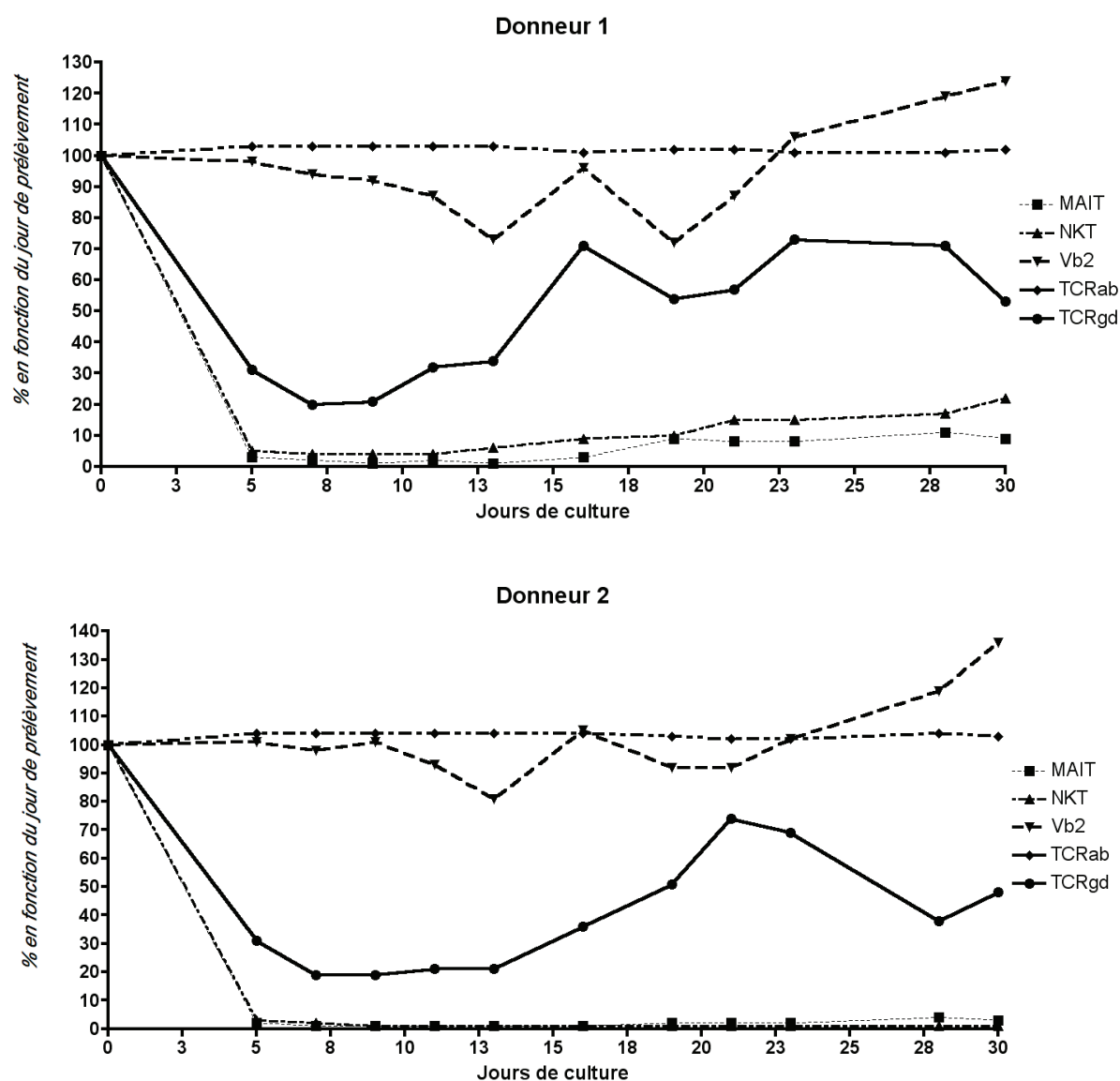
**Figure 43 : Les patients XLP-2 ne présentent pas de réduction de leur nombre de cellules T  $\gamma\delta$ .** Analyse par cytométrie des cellules T  $\gamma\delta$  de PBMC de contrôles (Ctr) et de patients XLP-2 (XIAP). Les cellules T  $\gamma\delta$  sont détectées par la combinaison CD3<sup>+</sup>TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>.



**Figure 44 : Apoptose *ex vivo* de PBMC.** Des PBMC de deux contrôles ont été stimulées par de la PHA (panel de gauche) ou par de l'OKT3 (panel de droite). L'apoptose des cellules T  $\alpha\beta$ , T V $\beta$ 2, T  $\gamma\delta$ , iNKT et MAIT a été mesurée.



## G. ANNEXE 7 : SUIVI A LONG TERME DE CULTURES DE BLASTES :

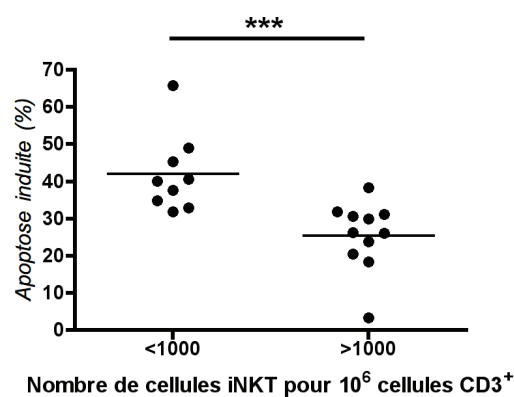


**Figure 45 : Suivi à long terme de culture de blastes.** Des PBMC de deux donneurs ont été stimulées avec de la PHA. Le pourcentage dans la culture des cellules MAIT, iNKT, Vβ2, T αβ et T γδ a été évalué régulièrement par cytométrie. Les données sont représentées en fonction de J = 0 où la valeur a été fixée à 100%.

	iNKT	MAIT	T γδ
Donneur 1	3480	28200	37900
Donneur 2	20300	67500	40000

**Tableau 7 : Nombre de cellules iNKT, MAIT et T γδ des donneurs avant stimulation par de la PHA.** Les nombres sont donnés pour 10<sup>6</sup> cellules T CD3<sup>+</sup>.

**H. ANNEXE 8 : CORRELATION ENTRE LE NOMBRE DE CELLULES iNKT ET L'APOPTOSE DE BLASTES DE DONNEURS SAINS :**

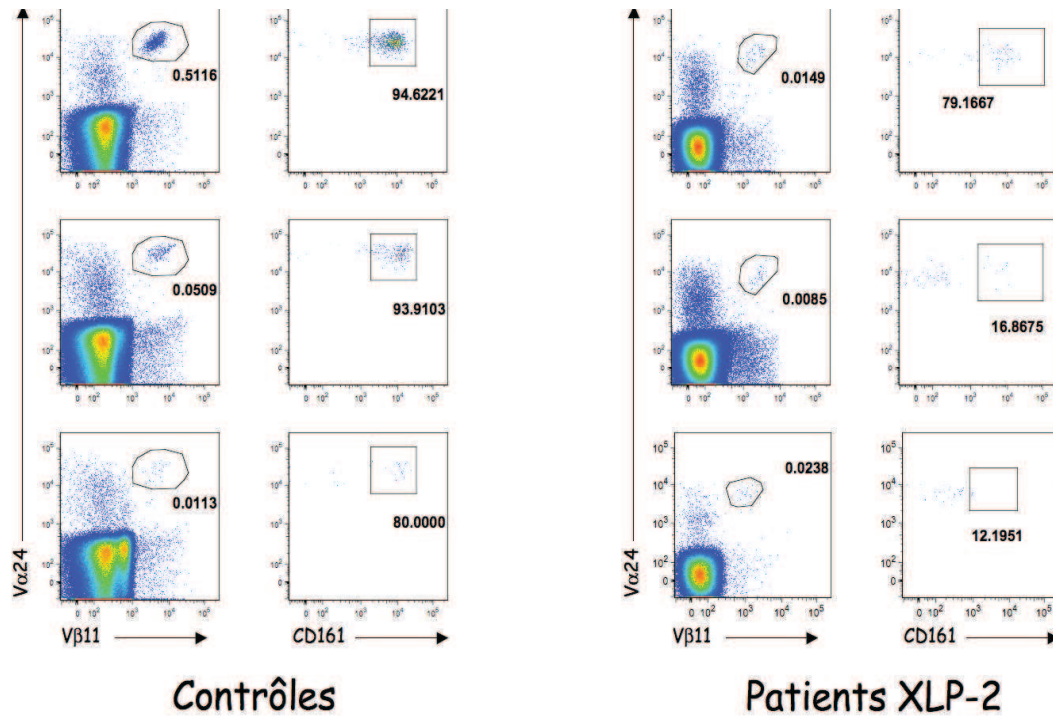


**Figure 46 : AICD sur blastes des différents donneurs.** Les blastes PHA des différents donneurs ont été stimulés par un anti-CD3 et l'apoptose induite a été évaluée. Les donneurs ont été classés en deux groupes en fonction de leur nombre de cellules iNKT. \*\*\*P<0.001

	Donneurs "bas" en cellules iNKT		Donneurs "hauts" en cellules iNKT	
	iNKT	MAIT	iNKT	MAIT
Donneur 1	86	14100	1250	8180
Donneur 2	113	46513	1330	12100
Donneur 3	169	34800	1342	18913
Donneur 4	181	5520	1960	8040
Donneur 5	366	14000	2490	13500
Donneur 6	443	22400	2500	8110
Donneur 7	509	15690	2690	17200
Donneur 8	517	15500	3590	7270
Donneur 9	550	9450	4220	6900
Donneur 10			5553	24448
Donneur 11			5930	26200

**Tableau 8 : Nombre de cellules iNKT et de cellules MAIT pour les donneurs.** Les nombres de cellules iNKT et de cellules MAIT des donneurs ayant servi à cette étude ont été rassemblés dans cette table en deux groupes selon leur nombre de cellules iNKT. Les nombres sont donnés pour 10<sup>6</sup> cellules T CD3<sup>+</sup>.

**I. ANNEXE 9 : PHENOTYPE DES CELLULES iNKT RESIDUELLES CHEZ LES PATIENTS XLP-2 :**



**Figure 47 : L'expression de CD161 peut être diminuée sur les cellules de patients XLP-2.** Des PBMC de trois contrôles (panel de gauche) et de trois patients XLP-2 (panel de droite) ont été marquées pour l'étude de leurs cellules iNKT. Elles ont été détectées par marquage par un anti-CD3, un anti-Vα24 et un anti-Vβ11. Un anti-CD161 a aussi été ajouté. La colonne de gauche de chaque panel représente l'ensemble des cellules CD3<sup>+</sup>. L'expression de CD161 sur les cellules CD3<sup>+</sup>Vα24<sup>+</sup>Vβ11<sup>+</sup> a ensuite été analysée (colonne de droite de chaque panel). Les contrôles et les patients montrés ici ont déjà été infectés par l'EBV.

## **VI. MATERIELS ET METHODES:**

### **Prélèvement de patients et de contrôles :**

Les échantillons de sang périphérique de patients portant des mutations dans SAP ou XIAP ont été prélevés après l'obtention d'un accord signé par les patients. Les prélèvements de témoins ont été obtenus auprès de l'Etablissement Français du Sang. Les protocoles d'études sont conformes à la déclaration d'Helsinki de 1975. Les cellules mononuclées du sang ont été obtenues par isolation sur gradient de ficoll selon des protocoles standards. Les prélèvements de sang de cordon ont été récoltés lors d'accouchements à terme de bébés sains après l'obtention de l'accord de la mère. Les thymus post-nataux ont été obtenus auprès d'enfants subissant une chirurgie cardiaque corrective (service de chirurgie cardiaque pédiatrique de l'hôpital Necker). Chaque thymus a été broyé mécaniquement avant d'être remis en culture.

### **Prélèvement de cellules murines :**

Après le sacrifice des souris, la rate, le foie et le thymus sont prélevés. Les organes sont dilacérés sur un filtre de 100  $\mu$ m. On utilise un protocole classique pour récupérer les lymphocytes hépatiques. Les rates sont traitées à l'ACK pour lyser les globules rouges. Pour toutes les expériences de culture de cellules de souris, on utilise un milieu particulier : RPMI +10% SVF + 1% Hépés + 4mg/ml  $\beta$ -Mercaptoéthanol + Pénicilline- Streptomycine.

### **Expansions :**

Pour les expansions, les PBMC des donneurs sont remis en culture dans du RPMI 1640 GlutaMax additionné de 10 % de SVF décomplémenté, 100 u/ml de pénicilline, 100 mg/ml de streptomycine et 1000 u/ml d'IL-2. Pour l'expansion des cellules iNKT, on ajoute 100 ng/ml d' $\alpha$ -Galactosylcéramide (Alexis). Pour l'expansion V $\beta$ 2, le milieu est additionné de 0,5  $\mu$ g/ml de toxine TSST-1. Après une semaine de culture, la proportion de cellules iNKT et de cellules V $\beta$ 2 dans la culture varie de 1,5% à 50% et de 10% à 70 % respectivement. Pour les expansions à partir de thymus humains, les cellules ont étéensemencées à 2,5 millions/ml. Pour l'expansion de cellules T anti-CMV, les PBMC de donneurs sains ont étéensemencés dans du RPMI 1640 GlutaMax additionné de 10 % de SAB décomplémenté, de 1000 U/ml d'IL-2 et en présence de 1,25  $\mu$ g/ml d'extrait cellulaire de cellules infectées par le HCMV. Pour les expansions iNKT correspondantes, le SVF a été remplacé par du SAB. Pour les expansions PHA, les PBMC de donneurs sains ont étéensemencés dans du RPMI 1640

GlutaMax additionné de 10 % de SAB décomplémenté, de 100 U/ml d'IL-2 et en présence de 25 µg/ml de PHA.

### **Cytométrie en flux :**

Les cellules ont été marquées selon des protocoles standards de marquage. Les cellules iNKT ont été détectées en marquant les PBL avec les anticorps monoclonaux suivants : anti-Vβ11-FITC (clone C21), anti-Vα24-PE (C15), et un anti-CD3-APC (SK7). Dans les expériences d'apoptose, les iNKT sont marqués soit avec un anti-TCRiNKT-PE (6B11, BD) ou avec un tétramère de CD1d couplé au glycolipide PBS-57 (*NIH Tetramer Core facility*), notamment dans les expériences de souris. Les cellules Vβ2 sont détectées en utilisant un anti-Vβ2 (MPB2D5, BC) en combinaison avec un anti CD3. Les lymphocytes T spécifiques du CMV sont détectés avec un tétramère de HLA-A\*0201 chargé avec le peptide NLMVPMVATV du CMV (BC). Les cellules MAIT sont détectées en utilisant un anti-CD161 (PK136, BD) et un anti-Vα7.2 (3C10). L'apoptose est évaluée par un marquage à l'Annexine V couplée à du FITC, PE, APC ou V500 et par un marquage par du 7-AAD (Viaprobe, BD). Les autres anticorps utilisés sont les anti-CD25 (M-A251), anti-CD45RO (UCHL1), anti-CD45RA (HI100), anti-CD69 (L78), anti-HLA-DR (L243), anti-CD95 (DX2), anti-CCR7 (3D12), anti-CD62L (Dreg 56) et anti-CD161 (PK136). Pour le marquage intracellulaire de XIAP, les cellules sont perméabilisées avec l'intraprep kit de Beckman Coulter et marquées avec un anticorps anti-XIAP (clone 48 de BD) et un anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à du Pacific Blue. Pour le marquage intracellulaire de PLZF et de KI-67, nous avons utilisé un anti-PLZF-APC (clone 6318100, R&D systems) et un anti-Ki-67-APC (clone B56, BD). L'acquisition des cellules ainsi marquées se fait sur un cytomètre Canto II de BD. Les données sont analysées avec le logiciel FlowJo (TreeStar).

### **Induction d'apoptose :**

Pour l'étude de l'AICD, les cellules ont été stimulées pendant 24 heures dans des plaques 48 puits pré-coatées avec de l'anti-CD3 à 10 mg/ml (clone OKT3 de Janssen-Cilag pour les expériences humaines, clone 2C11 de chez BD pour les expériences sur la souris). Dans les apoptoses médiées par FAS, les cellules ont été stimulées par un anticorps soluble anti-FAS (clone Apo1.3 de chez Alexis) aux concentrations de 6,25 à 100 ng/ml en plaque 96 puits. L'induction d'apoptose est optimisée en ajoutant un anticorps anti-souris pour cross-linker les anticorps anti-FAS. L'étoposide, la puromycine, l'eau oxygénée et la staurosporine utilisées pour les inductions d'apoptose par composés chimiques ont été obtenus auprès de

Sigma-Aldrich. L'inhibiteur large de caspases z-VAD vient de R&D systems et a été utilisé à 200  $\mu$ M. L'AICD a été bloqué par l'ajout de 3  $\mu$ g/ml d'anticorps bloquant anti-CD95 (clone SM-1 d'Alexis).

#### **Extinction de l'expression de XIAP et de PLZF:**

Afin d'étudier le rôle de XIAP dans l'homéostasie des lymphocytes iNKT, une approche de sh-RNA a été employée. Un set de 5 sh-RNA a été commandé auprès de la société Open Biosystem. Ces sh-RNA sont dans un vecteur lentiviral pLKO contenant le gène de la puromycine comme gène rapporteur. Un test sur des cellules 293T a montré que le clone TRCN0000003788 était le plus performant. La cassette de résistance à la puromycine a ensuite été remplacée par une cassette GFP.

Afin d'étudier le rôle de PLZF un set de 5 sh-RNA a été commandé auprès de la société Open Biosystem. Un test sur des cellules Jurkat a montré que le clone TRCN0000012940 était le plus performant. Nous avons aussi utilisé le clone n°TRCN0000012942.

#### **Expérience de dégranulation :**

Pour mesurer la capacité des cellules à dégranuler, nous effectuons un test par cytométrie de flux en testant la capacité des cellules à exprimer le marqueur d'exocytose LAMP1 et LAMP2 à leur surface. Les cellules sont donc mises en face de cibles en présence d'anticorps couplé à un fluorochrome anti-CD107a/b qui marquent LAMP1 et LAMP2. L'expression de ces marqueurs est ensuite mesurée par FACS.

#### **Détection des caspases activées par cytométrie :**

La détection des caspases activées se fait par l'utilisation d'un réactif le FLICA. Celui-ci est un inhibiteur des caspases activées fluorescent. Ce réactif traverse les membranes et n'est pas toxique pour les cellules. On peut ensuite effectuer des marquages extracellulaires avant de passer les cellules au FACS.

#### **Transfection des cellules :**

Dans toutes les expériences nécessitant des transfections de plasmides, nous avons utilisé le réactif Lipofectamine 2000 d'Invitrogen en suivant le protocole du fournisseur. Les plasmides utilisés ont été extraits de midiprep à l'aide du kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit d'Invitrogen.

### **Lignées B stables exprimant hCD1d :**

Afin de l'exprimer de manière exogène, l'ADNc de CD1d a été obtenu auprès d'ARN extrait de PBL totaux. L'ADNc correspondant a ensuite été cloné dans un vecteur lentiviral pTRIP contenant la GFP comme gène rapporteur. La production du lentivirus s'est faite de manière classique en utilisant les cellules 293T comme cellules productrices. Le surnageant viral a ensuite été mis en contact avec les cellules Akata ou Raji pendant 24h et en présence de protamine sulfate à 250 microgrammes/ml. Les cellules ont ensuite été triées sur un FACS ARIA II pour ne garder que les cellules GFP<sup>+</sup>. Après une remise en culture, les cellules ont été triées à nouveau pour assurer un maximum de pureté. L'expression de CD1d a ensuite été vérifiée par FACS.

### **Expérience de co-culture :**

Dans les expériences de co-culture, des cellules iNKT sont triées sur colonne magnétique à partir d'expansions de donneurs sains. Les cellules iNKT ainsi triées sont mises en présence de cible Raji exprimant ou non hCD1d et préchargées ou non en  $\alpha$ GalCer. La mesure de la production d'IFN- $\gamma$  dans le surnageant se fait à l'aide d'un kit DuoSet de R&D systems.

### **Étude de l'expression protéique par western blot:**

Des cellules issues d'expansions iNKT ou V $\beta$ 2 ont été triées comme expliqué précédemment. Ces cellules ont été lysées en suivant des protocoles standards. Les anticorps reconnaissant des protéines humaines suivants ont été utilisés : Anti XIAP (clone 28), anti SMAC (clone 7), anti FADD (clone 1) de chez Beckton Dickinson, anti Ku80 (clone KuAb-2) et anti Ku70 de chez NeoMarkers, anti Bax (clone 2772), anti Bcl-2 (clone 50E3), anti caspase-3 (clone 9662), anti caspase-9 (clone 9508), anti caspase-7 (clone 9492), anti Bim (clone 2819), anti Bid (clone 2002), de Cell Signaling Technology anti APAF-1 (clone 94408) de R&D Systems et anti-PLZF (clone D9) de Santa Cruz. La quantification des surexpressions de protéines par western blot a été faite à l'aide du logiciel ImageJ (NIH).

### **Surexpression de PLZF :**

Afin de l'exprimer de manière exogène, l'ADNc de PLZF a été obtenu auprès d'ARN extrait de cellules iNKT en expansion. L'ADNc correspondant a ensuite été cloné dans un vecteur lentiviral 7.3V5-topo contenant la GFP comme gène rapporteur. La production du lentivirus s'est faite de manière classique en utilisant les cellules 293T comme cellules productrices.



### **Mesure de l'activité du promoteur de la caspase 3 :**

Des cellules Jurkat TAg ont été transduites avec un vecteur lentiviral vide (7.3 d'Invitrogen) ou avec un vecteur codant pour PLZF. Les cellules ont ensuite été triées en fonction de l'expression de CD3 et de la GFP sur un trieur ARIA II. Puis les cellules ont ensuite été transfectées avec le vecteur pGL3-Basic luciférase vector (Promega) contenant le promoteur de la caspase 3 (un don du Dr. Bong Lee, NIH, Bethesda, MA). L'activité de la luciférase a été évaluée en utilisant le *luciferase assay system* (Promega) sur un Mithras Microplate Reader (Berthold Technologies).

## VII. BIBLIOGRAPHIE :

1. Bendelac, A., Bonneville, M. & Kearney, J. F. Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **1**, 177–86 (2001).
2. Ehrenstein, M. R. & Notley, C. A. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat Rev Immunol* **10**, 778–86 (2010).
3. Griffin, D. O., Holodick, N. E. & Rothstein, T. L. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70. *J Exp Med* **208**, 67–80 (2011).
4. Weller, S. *et al.* Human blood IgM ‘memory’ B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* **104**, 3647–54 (2004).
5. Sumida, T., Takei, I. & Taniguchi, M. Activation of acceptor-suppressor hybridoma with antigen-specific suppressor T cell factor of two-chain type: requirement of the antigen- and the I-J-restricting specificity. *J Immunol* **133**, 1131–6 (1984).
6. Koseki, H. *et al.* Homogenous junctional sequence of the V14+ T-cell antigen receptor alpha chain expanded in unprimed mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5248–52 (1990).
7. Porcelli, S., Yockey, C. E., Brenner, M. B. & Balk, S. P. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med* **178**, 1–16 (1993).
8. Dellabona, P., Padovan, E., Casorati, G., Brockhaus, M. & Lanzavecchia, A. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J Exp Med* **180**, 1171–6 (1994).
9. Exley, M., Garcia, J., Balk, S. P. & Porcelli, S. Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *J Exp Med* **186**, 109–20 (1997).
10. Bendelac, A., Killeen, N., Littman, D. R. & Schwartz, R. H. A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* **263**, 1774–8 (1994).
11. Bendelac, A. CD1: presenting unusual antigens to unusual T lymphocytes. *Science* **269**, 185–6 (1995).
12. Kobayashi, E., Motoki, K., Uchida, T., Fukushima, H. & Koezuka, Y. KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol Res* **7**, 529–34 (1995).
13. Godfrey, D. I., MacDonald, H. R., Kronenberg, M., Smyth, M. J. & Van Kaer, L. NKT cells: what’s in a name? *Nat Rev Immunol* **4**, 231–7 (2004).
14. Arrenberg, P., Halder, R. & Kumar, V. Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *J Cell Physiol* **218**, 246–50 (2009).
15. Jahng, A. *et al.* Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J Exp Med* **199**, 947–57 (2004).
16. Uldrich, A. P. *et al.* A semi-invariant Valpha10+ T cell antigen receptor defines a population of natural killer T cells with distinct glycolipid antigen-recognition properties. *Nat Immunol* **12**, 616–23 (2010).

17. Brossay, L. *et al.* CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J Exp Med* **188**, 1521–8 (1998).
18. Brozovic, S. *et al.* CD1d function is regulated by microsomal triglyceride transfer protein. *Nat Med* **10**, 535–9 (2004).
19. Dougan, S. K. *et al.* Microsomal triglyceride transfer protein lipidation and control of CD1d on antigen-presenting cells. *J Exp Med* **202**, 529–39 (2005).
20. Zhou, D. *et al.* Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* **306**, 1786–9 (2004).
21. Kronenberg, M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* **23**, 877–900 (2005).
22. Roark, J. H. *et al.* CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. *J Immunol* **160**, 3121–7 (1998).
23. Brossay, L. *et al.* Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells. *J Immunol* **159**, 1216–24 (1997).
24. Skold, M., Xiong, X., Illarionov, P. A., Besra, G. S. & Behar, S. M. Interplay of cytokines and microbial signals in regulation of CD1d expression and NKT cell activation. *J Immunol* **175**, 3584–93 (2005).
25. Bendelac, A., Savage, P. B. & Teyton, L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* **25**, 297–336 (2007).
26. Hachem, P. *et al.* Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma. *Eur J Immunol* **35**, 2793–802 (2005).
27. Kim, H. Y. *et al.* The development of airway hyperreactivity in T-bet-deficient mice requires CD1d-restricted NKT cells. *J Immunol* **182**, 3252–61 (2009).
28. Berzins, S. P., Cochrane, A. D., Pellicci, D. G., Smyth, M. J. & Godfrey, D. I. Limited correlation between human thymus and blood NKT cell content revealed by an ontogeny study of paired tissue samples. *Eur J Immunol* **35**, 1399–407 (2005).
29. Matangkasombut, P. *et al.* Natural killer T cells in the lungs of patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* **123**, 1181–5 (2009).
30. Lynch, L. *et al.* Invariant NKT cells and CD1d(+) cells amass in human omentum and are depleted in patients with cancer and obesity. *Eur J Immunol* **39**, 1893–901 (2009).
31. Robson MacDonald, H., Lees, R. K. & Held, W. Developmentally regulated extinction of Ly-49 receptor expression permits maturation and selection of NK1.1+ T cells. *J Exp Med* **187**, 2109–14 (1998).
32. Stetson, D. B. *et al.* Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J Exp Med* **198**, 1069–76 (2003).
33. D'Andrea, A. *et al.* Neonatal invariant Valpha24+ NKT lymphocytes are activated memory cells. *Eur J Immunol* **30**, 1544–50 (2000).
34. Berzins, S. P., Smyth, M. J. & Baxter, A. G. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol* **11**, 131–42 (2011).

35. Kuylensstierna, C. *et al.* NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d. *Eur J Immunol* **41**, 1913–23 (2011).
36. Kawano, T. *et al.* A novel recognition motif of human NKT antigen receptor for a glycolipid ligand. *Int Immunol* **11**, 881–7 (1999).
37. de Lalla, C. *et al.* Innate-like effector differentiation of human invariant NKT cells driven by IL-7. *J Immunol* **180**, 4415–24 (2008).
38. Thedrez, A. *et al.* CD4 engagement by CD1d potentiates activation of CD4<sup>+</sup> invariant NKT cells. *Blood* **110**, 251–8 (2007).
39. Gumperz, J. E., Miyake, S., Yamamura, T. & Brenner, M. B. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* **195**, 625–36 (2002).
40. Lee, P. T., Benlagha, K., Teyton, L. & Bendelac, A. Distinct functional lineages of human V( $\alpha$ )24 natural killer T cells. *J Exp Med* **195**, 637–41 (2002).
41. Crowe, N. Y. *et al.* Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J Exp Med* **202**, 1279–88 (2005).
42. von Boehmer, H. Unique features of the pre-T-cell receptor  $\alpha$ -chain: not just a surrogate. *Nat Rev Immunol* **5**, 571–7 (2005).
43. Pellicci, D. G. *et al.* A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med* **195**, 835–44 (2002).
44. Benlagha, K., Kyin, T., Beavis, A., Teyton, L. & Bendelac, A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* **296**, 553–5 (2002).
45. Gadue, P. & Stein, P. L. NK T cell precursors exhibit differential cytokine regulation and require Itk for efficient maturation. *J Immunol* **169**, 2397–406 (2002).
46. Gapin, L., Matsuda, J. L., Surh, C. D. & Kronenberg, M. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* **2**, 971–8 (2001).
47. Godfrey, D. I., Stankovic, S. & Baxter, A. G. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol* **11**, 197–206 (2010).
48. McNab, F. W. *et al.* Peripheral NK1.1 NKT cells are mature and functionally distinct from their thymic counterparts. *J Immunol* **179**, 6630–7 (2007).
49. Milpied, P. *et al.* Neuropilin-1 is not a marker of human Foxp3<sup>+</sup> Treg. *Eur J Immunol* **39**, 1466–71 (2009).
50. Franki, A. S. *et al.* A unique lymphotoxin  $\alpha\beta$ -dependent pathway regulates thymic emigration of V $\alpha$ 14 invariant natural killer T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9160–5 (2006).
51. Allende, M. L. *et al.* S1P1 receptor expression regulates emergence of NKT cells in peripheral tissues. *Faseb J* **22**, 307–15 (2008).
52. Drennan, M. B. *et al.* Cutting edge: the chemokine receptor CXCR3 retains invariant NK T cells in the thymus. *J. Immunol.* **183**, 2213–2216 (2009).
53. Michel, M. L. *et al.* Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* **204**, 995–1001 (2007).

54. Michel, M. L. *et al.* Critical role of ROR-gammat in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 19845–50 (2008).
55. Doisne, J. M. *et al.* Skin and peripheral lymph node invariant NKT cells are mainly retinoic acid receptor-related orphan receptor (gamma)t+ and respond preferentially under inflammatory conditions. *J Immunol* **183**, 2142–9 (2009).
56. Havenar-Daughton, C., Li, S., Benlagha, K. & Marie, J. C. Development and function of murine RORgammat(+) iNKT cells are under TGF-beta signaling control. *Blood* **119**, 3486–94 (2012).
57. Egawa, T. *et al.* Genetic evidence supporting selection of the Valpha14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors. *Immunity* **22**, 705–716 (2005).
58. Baev, D. V. *et al.* Distinct homeostatic requirements of CD4+ and CD4- subsets of Valpha24-invariant natural killer T cells in humans. *Blood* **104**, 4150–6 (2004).
59. Doisne, J. M. *et al.* Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1- invariant NKT cells to bacteria. *J Immunol* **186**, 662–6 (2011).
60. Moreira-Teixeira, L. *et al.* Proinflammatory environment dictates the IL-17-producing capacity of human invariant NKT cells. *J Immunol* **186**, 5758–65 (2011).
61. Coles, M. C. & Raulet, D. H. Class I dependence of the development of CD4+ CD8- NK1.1+ thymocytes. *J Exp Med* **180**, 395–9 (1994).
62. Bendelac, A. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J Exp Med* **182**, 2091–6 (1995).
63. Xu, H., Chun, T., Colmone, A., Nguyen, H. & Wang, C. R. Expression of CD1d under the control of a MHC class Ia promoter skews the development of NKT cells, but not CD8+ T cells. *J Immunol* **171**, 4105–12 (2003).
64. Sillé, F. C. M. *et al.* Critical role for invariant chain in CD1d-mediated selection and maturation of Va14-invariant NKT cells. *Immunol. Lett.* **139**, 33–41 (2011).
65. Stanic, A. K. *et al.* Cutting edge: the ontogeny and function of Va14Ja18 natural T lymphocytes require signal processing by protein kinase C theta and NF-kappa B. *J Immunol* **172**, 4667–71 (2004).
66. Pellicci, D. G. *et al.* Intrathymic NKT cell development is blocked by the presence of alpha-galactosylceramide. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1816–1823 (2003).
67. Schümann, J. *et al.* Targeted expression of human CD1d in transgenic mice reveals independent roles for thymocytes and thymic APCs in positive and negative selection of Valpha14i NKT cells. *J. Immunol.* **175**, 7303–7310 (2005).
68. Wei, D. G. *et al.* Expansion and long-range differentiation of the NKT cell lineage in mice expressing CD1d exclusively on cortical thymocytes. *J Exp Med* **202**, 239–48 (2005).
69. Makino, Y., Kanno, R., Koseki, H. & Taniguchi, M. Development of Valpha4+ NK T cells in the early stages of embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6516–20 (1996).
70. Shimamura, M., Ohteki, T., Beutner, U. & MacDonald, H. R. Lack of directed V alpha 14-J alpha 281 rearrangements in NK1+ T cells. *Eur J Immunol* **27**, 1576–9 (1997).

71. Lantz, O. & Bendelac, A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> T cells in mice and humans. *J Exp Med* **180**, 1097–106 (1994).
72. Pei, B. *et al.* Diverse endogenous antigens for mouse NKT cells: self-antigens that are not glycosphingolipids. *J Immunol* **186**, 1348–60 (2011).
73. Gapin, L. iNKT cell autoreactivity: what is ‘self’ and how is it recognized? *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 272–277 (2010).
74. Stanic, A. K. *et al.* Defective presentation of the CD1d1-restricted natural Val4Ja18 NKT lymphocyte antigen caused by beta-D-glucosylceramide synthase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1849–54 (2003).
75. Wei, D. G., Curran, S. A., Savage, P. B., Teyton, L. & Bendelac, A. Mechanisms imposing the Vbeta bias of Valpha14 natural killer T cells and consequences for microbial glycolipid recognition. *J Exp Med* **203**, 1197–207 (2006).
76. Xia, C. *et al.* Thio-isoglobotrihexosylceramide, an agonist for activating invariant natural killer T cells. *Org Lett* **8**, 5493–6 (2006).
77. Darmoise, A. *et al.* Lysosomal alpha-galactosidase controls the generation of self lipid antigens for natural killer T cells. *Immunity* **33**, 216–28 (2010).
78. Mattner, J. *et al.* Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* **434**, 525–9 (2005).
79. Porubsky, S. *et al.* Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5977–82 (2007).
80. Speak, A. O. *et al.* Implications for invariant natural killer T cell ligands due to the restricted presence of isoglobotrihexosylceramide in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5971–6 (2007).
81. Brennan, P. J. *et al.* Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nat Immunol* **12**, 1202–11 (2012).
82. Facciotti, F. *et al.* Peroxisome-derived lipids are self antigens that stimulate invariant natural killer T cells in the thymus. *Nat Immunol* **13**, 474–80 (2012).
83. D’Cruz, L. M., Yang, C. Y. & Goldrath, A. W. Transcriptional regulation of NKT cell development and homeostasis. *Curr Opin Immunol* **22**, 199–205 (2010).
84. Das, R., Sant’Angelo, D. B. & Nichols, K. E. Transcriptional control of invariant NKT cell development. *Immunol Rev* **238**, 195–215 (2010).
85. Kim, P. J. *et al.* GATA-3 regulates the development and function of invariant NKT cells. *J Immunol* **177**, 6650–9 (2006).
86. Bezbradica, J. S. *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates effector differentiation of invariant natural killer T cells during thymic ontogeny. *Immunity* **25**, 487–97 (2006).
87. Hu, T., Simmons, A., Yuan, J., Bender, T. P. & Alberola-Ila, J. The transcription factor c-Myb primes CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> immature thymocytes for selection into the iNKT lineage. *Nat Immunol* **11**, 435–41 (2010).
88. Sun, Z. *et al.* Requirement for RORgamma in thymocyte survival and lymphoid organ development. *Science* **288**, 2369–73 (2000).



89. D'Cruz, L. M., Knell, J., Fujimoto, J. K. & Goldrath, A. W. An essential role for the transcription factor HEB in thymocyte survival, Tcra rearrangement and the development of natural killer T cells. *Nat. Immunol.* **11**, 240–249 (2010).
90. Zimmer, M. I. *et al.* A cell-type specific CD1d expression program modulates invariant NKT cell development and function. *J Immunol* **176**, 1421–30 (2006).
91. McNab, F. W. *et al.* The influence of CD1d in postselection NKT cell maturation and homeostasis. *J Immunol* **175**, 3762–8 (2005).
92. Bosma, A., Abdel-Gadir, A., Isenberg, D. A., Jury, E. C. & Mauri, C. Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity* **36**, 477–90 (2012).
93. Albu, D. I. *et al.* Transcription factor Bcl11b controls selection of invariant natural killer T-cells by regulating glycolipid presentation in double-positive thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 6211–6216 (2011).
94. Pasquier, B. *et al.* Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med* **201**, 695–701 (2005).
95. Eberl, G., Lowin-Kropf, B. & MacDonald, H. R. Cutting edge: NKT cell development is selectively impaired in Fyn- deficient mice. *J Immunol* **163**, 4091–4 (1999).
96. Griewank, K. *et al.* Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity* **27**, 751–62 (2007).
97. Kageyama, R. *et al.* The Receptor Ly108 Functions as a SAP Adaptor-Dependent On-Off Switch for T Cell Help to B Cells and NKT Cell Development. *Immunity* (2012).doi:10.1016/j.immuni.2012.05.016
98. Readinger, J. A., Mueller, K. L., Venegas, A. M., Horai, R. & Schwartzberg, P. L. Tec kinases regulate T-lymphocyte development and function: new insights into the roles of Itk and Rlk/Txk. *Immunol Rev* **228**, 93–114 (2009).
99. Felices, M. & Berg, L. J. The Tec kinases Itk and Rlk regulate NKT cell maturation, cytokine production, and survival. *J Immunol* **180**, 3007–18 (2008).
100. Au-Yeung, B. B. & Fowell, D. J. A key role for Itk in both IFN gamma and IL-4 production by NKT cells. *J Immunol* **179**, 111–9 (2007).
101. Huck, K. *et al.* Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation. *J Clin Invest* **119**, 1350–8 (2009).
102. Linka, R. M. *et al.* Loss-of-function mutations within the IL-2 inducible kinase ITK in patients with EBV-associated lymphoproliferative diseases. *Leukemia* **26**, 963–71 (2012).
103. Lazarevic, V. *et al.* The gene encoding early growth response 2, a target of the transcription factor NFAT, is required for the development and maturation of natural killer T cells. *Nat Immunol* **10**, 306–13 (2009).
104. Seiler, M. P. *et al.* Elevated and sustained expression of the transcription factors Egr1 and Egr2 controls NKT lineage differentiation in response to TCR signaling. *Nat Immunol* **13**, 264–71 (2012).



105. Kovalovsky, D. *et al.* The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nat Immunol* **9**, 1055–64 (2008).
106. Savage, A. K. *et al.* The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity* **29**, 391–403 (2008).
107. Raberger, J. *et al.* The transcriptional regulator PLZF induces the development of CD44 high memory phenotype T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 17919–24 (2008).
108. Eidson, M. *et al.* Altered development of NKT cells, gammadelta T cells, CD8 T cells and NK cells in a PLZF deficient patient. *PLoS One* **6**, e24441 (2011).
109. Townsend, M. J. *et al.* T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity* **20**, 477–94 (2004).
110. Matsuda, J. L. *et al.* T-bet concomitantly controls migration, survival, and effector functions during the development of Valpha14i NKT cells. *Blood* **107**, 2797–805 (2006).
111. Ranson, T. *et al.* IL-15 availability conditions homeostasis of peripheral natural killer T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2663–8 (2003).
112. Gordy, L. E. *et al.* IL-15 regulates homeostasis and terminal maturation of NKT cells. *J Immunol* **187**, 6335–45 (2011).
113. Matsuda, J. L. *et al.* Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nat Immunol* **3**, 966–74 (2002).
114. Vicari, A. P. *et al.* NK1.1+ T cells from IL-7-deficient mice have a normal distribution and selection but exhibit impaired cytokine production. *Int Immunol* **8**, 1759–66 (1996).
115. Boesteanu, A. *et al.* Distinct roles for signals relayed through the common cytokine receptor gamma chain and interleukin 7 receptor alpha chain in natural T cell development. *J Exp Med* **186**, 331–6 (1997).
116. Vandenabeele, P., Declercq, W., Beyaert, R. & Fiers, W. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* **5**, 392–9 (1995).
117. Crowe, P. D. *et al.* A lymphotoxin-beta-specific receptor. *Science* **264**, 707–10 (1994).
118. Elewaut, D. *et al.* Membrane lymphotoxin is required for the development of different subpopulations of NK T cells. *J Immunol* **165**, 671–9 (2000).
119. Elewaut, D. *et al.* NIK-dependent RelB activation defines a unique signaling pathway for the development of V alpha 14i NKT cells. *J Exp Med* **197**, 1623–33 (2003).
120. Schmidt-Suppran, M. *et al.* Differential dependence of CD4+CD25+ regulatory and natural killer-like T cells on signals leading to NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4566–71 (2004).
121. Sivakumar, V., Hammond, K. J., Howells, N., Pfeffer, K. & Weih, F. Differential requirement for Rel/nuclear factor kappa B family members in natural killer T cell development. *J Exp Med* **197**, 1613–21 (2003).
122. Thrasher, A. J. & Burns, S. O. WASP: a key immunological multitasker. *Nat Rev Immunol* **10**, 182–92 (2010).
123. Astrakhan, A., Ochs, H. D. & Rawlings, D. J. Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for homeostasis and function of invariant NKT cells. *J Immunol* **182**, 7370–80 (2009).

124. Locci, M. *et al.* The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for iNKT cell maturation and function. *J Exp Med* **206**, 735–42 (2009).
125. Doisne, J. M. *et al.* iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling. *J Exp Med* **206**, 1365–78 (2009).
126. Brutkiewicz, R. R. CD1d ligands: the good, the bad, and the ugly. *J Immunol* **177**, 769–75 (2006).
127. Venkataswamy, M. M. & Porcelli, S. A. Lipid and glycolipid antigens of CD1d-restricted natural killer T cells. *Semin Immunol* **22**, 68–78 (2010).
128. Fischer, K. *et al.* Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10685–90 (2004).
129. Kinjo, Y. *et al.* Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol* **7**, 978–86 (2006).
130. Amprey, J. L. *et al.* A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *J Exp Med* **200**, 895–904 (2004).
131. Kinjo, Y. *et al.* Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* **434**, 520–5 (2005).
132. Sriram, V., Du, W., Gervay-Hague, J. & Brutkiewicz, R. R. Cell wall glycosphingolipids of *Sphingomonas paucimobilis* are CD1d-specific ligands for NKT cells. *Eur J Immunol* **35**, 1692–701 (2005).
133. Chang, Y. J. *et al.* Influenza infection in suckling mice expands an NKT cell subset that protects against airway hyperreactivity. *J Clin Invest* **121**, 57–69 (2011).
134. Kinjo, Y. *et al.* Invariant natural killer T cells recognize glycolipids from pathogenic Gram-positive bacteria. *Nat Immunol* **12**, 966–74 (2011).
135. Salio, M. *et al.* Modulation of human natural killer T cell ligands on TLR-mediated antigen-presenting cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 20490–5 (2007).
136. Paget, C. *et al.* Activation of invariant NKT cells by toll-like receptor 9-stimulated dendritic cells requires type I interferon and charged glycosphingolipids. *Immunity* **27**, 597–609 (2007).
137. Fox, L. M. *et al.* Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes. *PLoS Biol.* **7**, e1000228 (2009).
138. Brigl, M., Bry, L., Kent, S. C., Gumperz, J. E. & Brenner, M. B. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* **4**, 1230–7 (2003).
139. Raghuraman, G., Geng, Y. & Wang, C. R. IFN-beta-mediated up-regulation of CD1d in bacteria-infected APCs. *J Immunol* **177**, 7841–8 (2006).
140. Muindi, K. *et al.* Activation state and intracellular trafficking contribute to the repertoire of endogenous glycosphingolipids presented by CD1d [corrected]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 3052–7 (2010).
141. Zeissig, S. *et al.* Hepatitis B virus-induced lipid alterations contribute to natural killer T cell-dependent protective immunity. *Nature medicine* (2012).doi:10.1038/nm.2811
142. Nagarajan, N. A. & Kronenberg, M. Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *J Immunol* **178**, 2706–13 (2007).

143. Wesley, J. D., Tessmer, M. S., Chaukos, D. & Brossay, L. NK cell-like behavior of Valpha14i NK T cells during MCMV infection. *PLoS Pathog* **4**, e1000106 (2008).
144. Leite-De-Moraes, M. C. *et al.* A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *J Immunol* **163**, 5871–6 (1999).
145. Eberl, G. & MacDonald, H. R. Rapid death and regeneration of NKT cells in anti-CD3epsilon- or IL-12-treated mice: a major role for bone marrow in NKT cell homeostasis. *Immunity* **9**, 345–53 (1998).
146. Park, S. H., Kyin, T., Bendelac, A. & Carnaud, C. The contribution of NKT cells, NK cells, and other gamma-chain-dependent non-T non-B cells to IL-12-mediated rejection of tumors. *J Immunol* **170**, 1197–201 (2003).
147. Brigl, M. & Brenner, M. B. How invariant natural killer T cells respond to infection by recognizing microbial or endogenous lipid antigens. *Semin. Immunol.* **22**, 79–86 (2010).
148. Brigl, M. *et al.* Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. *J Exp Med* **208**, 1163–77 (2011).
149. Wilson, M. T. *et al.* The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10913–8 (2003).
150. Parekh, V. V. *et al.* Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. *J Clin Invest* **115**, 2572–83 (2005).
151. Godfrey, D. I. & Kronenberg, M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* **114**, 1379–88 (2004).
152. Sullivan, B. A. *et al.* Mechanisms for glycolipid antigen-driven cytokine polarization by Valpha14i NKT cells. *J. Immunol.* **184**, 141–153 (2010).
153. Monteiro, M. *et al.* Identification of regulatory Foxp3<sup>+</sup> invariant NKT cells induced by TGF-beta. *J Immunol* **185**, 2157–63 (2010).
154. Chen, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> naive T cells to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* **198**, 1875–86 (2003).
155. Marie, J. C., Letterio, J. J., Gavin, M. & Rudensky, A. Y. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **201**, 1061–1067 (2005).
156. Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y. & Sakaguchi, S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* **3**, 135–42 (2002).
157. McHugh, R. S. *et al.* CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* **16**, 311–23 (2002).
158. Engelmann, P. *et al.* Characterization of human invariant natural killer T cells expressing FoxP3. *Int Immunol* **23**, 473–84 (2011).
159. Valmori, D. *et al.* Rapamycin-mediated enrichment of T cells with regulatory activity in stimulated CD4<sup>+</sup> T cell cultures is not due to the selective expansion of naturally

- occurring regulatory T cells but to the induction of regulatory functions in conventional CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **177**, 944–9 (2006).
160. Moreira-Teixeira, L. *et al.* Rapamycin combined with TGF-beta converts human invariant NKT cells into suppressive Foxp3<sup>+</sup> regulatory cells. *J Immunol* **188**, 624–31 (2012).
  161. Tracey, K. J. The inflammatory reflex. *Nature* **420**, 853–9 (2002).
  162. Tracey, K. J. Reflex control of immunity. *Nat Rev Immunol* **9**, 418–28 (2009).
  163. Minagawa, M. *et al.* Intensive expansion of natural killer T cells in the early phase of hepatocyte regeneration after partial hepatectomy in mice and its association with sympathetic nerve activation. *Hepatology* **31**, 907–15 (2000).
  164. Wong, C. H., Jenne, C. N., Lee, W. Y., Leger, C. & Kubes, P. Functional innervation of hepatic iNKT cells is immunosuppressive following stroke. *Science* **334**, 101–5 (2011).
  165. Ho, L. P., Urban, B. C., Jones, L., Ogg, G. S. & McMichael, A. J. CD4(-)CD8alphaalpha subset of CD1d-restricted NKT cells controls T cell expansion. *J Immunol* **172**, 7350–8 (2004).
  166. Kronenberg, M. & Gapin, L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 557–68 (2002).
  167. Nakamatsu, M. *et al.* Role of interferon-gamma in Valpha14<sup>+</sup> natural killer T cell-mediated host defense against *Streptococcus pneumoniae* infection in murine lungs. *Microbes Infect* **9**, 364–74 (2007).
  168. La Cava, A., Van Kaer, L. & Fu Dong, S. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends Immunol* **27**, 322–7 (2006).
  169. Jin, N. *et al.* Airway hyperresponsiveness through synergy of gammadelta<sup>+</sup> T cells and NKT cells. *J Immunol* **179**, 2961–8 (2007).
  170. Galli, G. *et al.* CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *J Exp Med* **197**, 1051–7 (2003).
  171. Galli, G. *et al.* Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3984–9 (2007).
  172. Leadbetter, E. A. *et al.* NK T cells provide lipid antigen-specific cognate help for B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8339–44 (2008).
  173. Barral, P. *et al.* B cell receptor-mediated uptake of CD1d-restricted antigen augments antibody responses by recruiting invariant NKT cell help in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8345–50 (2008).
  174. Chang, P. P. *et al.* Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. *Nat Immunol* **13**, 35–43 (2011).
  175. King, I. L. *et al.* Invariant natural killer T cells direct B cell responses to cognate lipid antigen in an IL-21-dependent manner. *Nat Immunol* **13**, 44–50 (2011).
  176. Tonti, E. *et al.* Follicular helper NKT cells induce limited B cell responses and germinal center formation in the absence of CD4(+) T cell help. *J Immunol* **188**, 3217–22 (2012).
  177. Bellone, M. *et al.* iNKT cells control mouse spontaneous carcinoma independently of tumor-specific cytotoxic T cells. *PLoS One* **5**, e8646 (2010).

178. Metelitsa, L. S., Weinberg, K. I., Emanuel, P. D. & Seeger, R. C. Expression of CD1d by myelomonocytic leukemias provides a target for cytotoxic NKT cells. *Leukemia* **17**, 1068–77 (2003).
179. Crowe, N. Y., Smyth, M. J. & Godfrey, D. I. A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Exp Med* **196**, 119–27 (2002).
180. Wu, D. Y., Segal, N. H., Sidobre, S., Kronenberg, M. & Chapman, P. B. Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J Exp Med* **198**, 173–81 (2003).
181. Shimizu, K., Kurosawa, Y., Taniguchi, M., Steinman, R. M. & Fujii, S. Cross-presentation of glycolipid from tumor cells loaded with alpha-galactosylceramide leads to potent and long-lived T cell mediated immunity via dendritic cells. *J Exp Med* **204**, 2641–53 (2007).
182. De Santo, C. *et al.* Invariant NKT cells reduce the immunosuppressive activity of influenza A virus-induced myeloid-derived suppressor cells in mice and humans. *J Clin Invest* **118**, 4036–48 (2008).
183. Renukaradhya, G. J. *et al.* Type I NKT cells protect (and type II NKT cells suppress) the host's innate antitumor immune response to a B-cell lymphoma. *Blood* **111**, 5637–45 (2008).
184. Song, L. *et al.* Valpha24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages. *J Clin Invest* **119**, 1524–36 (2009).
185. De Santo, C. *et al.* Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat Immunol* **11**, 1039–46 (2010).
186. Hayakawa, Y. *et al.* IFN-gamma-mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, alpha-galactosylceramide. *Blood* **100**, 1728–33 (2002).
187. Zeng, W. *et al.* Selective reduction of natural killer T cells in the bone marrow of aplastic anaemia. *Br J Haematol* **119**, 803–9 (2002).
188. Fujii, S. *et al.* Severe and selective deficiency of interferon-gamma-producing invariant natural killer T cells in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* **122**, 617–22 (2003).
189. de Lalla, C. *et al.* Invariant NKT cell reconstitution in pediatric leukemia patients given HLA-haploidentical stem cell transplantation defines distinct CD4+ and CD4- subset dynamics and correlates with remission state. *J Immunol* **186**, 4490–9 (2011).
190. Behar, S. M. & Porcelli, S. A. CD1-restricted T cells in host defense to infectious diseases. *Curr Top Microbiol Immunol* **314**, 215–50 (2007).
191. Joyee, A. G. *et al.* Distinct NKT cell subsets are induced by different Chlamydia species leading to differential adaptive immunity and host resistance to the infections. *J Immunol* **178**, 1048–58 (2007).
192. Bessoles, S., Dudal, S., Besra, G. S., Sanchez, F. & Lafont, V. Human CD4+ invariant NKT cells are involved in antibacterial immunity against *Brucella suis* through CD1d-dependent but CD4-independent mechanisms. *Eur J Immunol* **39**, 1025–35 (2009).



193. Grubor-Bauk, B., Arthur, J. L. & Mayrhofer, G. Importance of NKT cells in resistance to herpes simplex virus, fate of virus-infected neurons, and level of latency in mice. *J Virol* **82**, 11073–83 (2008).
194. Gill, N., Rosenthal, K. L. & Ashkar, A. A. NK and NKT cell-independent contribution of interleukin-15 to innate protection against mucosal viral infection. *J Virol* **79**, 4470–8 (2005).
195. Diana, J. & Lehuen, A. NKT cells: friend or foe during viral infections? *Eur J Immunol* **39**, 3283–91 (2009).
196. Motsinger, A. *et al.* CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med* **195**, 869–79 (2002).
197. van der Vliet, H. J. *et al.* Selective decrease in circulating V alpha 24+V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection. *J Immunol* **168**, 1490–5 (2002).
198. Tripathy, A. S., Das, R., Chadha, M. S. & Arankalle, V. A. Epidemic of hepatitis B with high mortality in India: association of fulminant disease with lack of CCL4 and natural killer T cells. *J Viral Hepat* **18**, e415–22 (2011).
199. Kakimi, K., Guidotti, L. G., Koezuka, Y. & Chisari, F. V. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* **192**, 921–30 (2000).
200. de Lalla, C. *et al.* Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis progression in chronic viral hepatitis. *J Immunol* **173**, 1417–25 (2004).
201. Inoue, M. *et al.* Enhanced ability of peripheral invariant natural killer T cells to produce IL-13 in chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* **45**, 190–6 (2006).
202. Kamijuku, H. *et al.* Mechanism of NKT cell activation by intranasal coadministration of alpha-galactosylceramide, which can induce cross-protection against influenza viruses. *Mucosal Immunol* **1**, 208–218 (2008).
203. Grubor-Bauk, B., Simmons, A., Mayrhofer, G. & Speck, P. G. Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J Immunol* **170**, 1430–4 (2003).
204. Banovic, T. *et al.* Disseminated varicella infection caused by varicella vaccine strain in a child with low invariant natural killer T cells and diminished CD1d expression. *J Infect Dis* **204**, 1893–901 (2011).
205. Levy, O. *et al.* Disseminated varicella infection due to the vaccine strain of varicella-zoster virus, in a patient with a novel deficiency in natural killer T cells. *J Infect Dis* **188**, 948–53 (2003).
206. Xiao, W. *et al.* EBV-induced human CD8(+) NKT cells synergise CD4(+) NKT cells suppressing EBV-associated tumours upon induction of Th1-bias. *Cell Mol Immunol* **6**, 367–79 (2009).
207. Yuling, H. *et al.* EBV-induced human CD8+ NKT cells suppress tumorigenesis by EBV-associated malignancies. *Cancer Res* **69**, 7935–44 (2009).
208. Webb, T. J. *et al.* Inhibition of CD1d1-mediated antigen presentation by the vaccinia virus B1R and H5R molecules. *Eur J Immunol* **36**, 2595–600 (2006).
209. Hage, C. A. *et al.* Human immunodeficiency virus gp120 downregulates CD1d cell surface expression. *Immunol Lett* **98**, 131–5 (2005).

210. Moll, M., Andersson, S. K., Smed-Sorensen, A. & Sandberg, J. K. Inhibition of lipid antigen presentation in dendritic cells by HIV-1 Vpu interference with CD1d recycling from endosomal compartments. *Blood* **116**, 1876–84 (2010).
211. Chen, N. *et al.* HIV-1 down-regulates the expression of CD1d via Nef. *Eur J Immunol* **36**, 278–86 (2006).
212. Cho, S. *et al.* Impaired cell surface expression of human CD1d by the formation of an HIV-1 Nef/CD1d complex. *Virology* **337**, 242–52 (2005).
213. Miura, S. *et al.* CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. *J Virol* **84**, 11614–23 (2010).
214. Sanchez, D. J., Gumperz, J. E. & Ganem, D. Regulation of CD1d expression and function by a herpesvirus infection. *J Clin Invest* **115**, 1369–78 (2005).
215. Yuan, W., Dasgupta, A. & Cresswell, P. Herpes simplex virus evades natural killer T cell recognition by suppressing CD1d recycling. *Nat Immunol* **7**, 835–42 (2006).
216. Hammond, K. J. & Kronenberg, M. Natural killer T cells: natural or unnatural regulators of autoimmunity? *Curr Opin Immunol* **15**, 683–9 (2003).
217. Yamamura, T., Sakuishi, K., Illes, Z. & Miyake, S. Understanding the behavior of invariant NKT cells in autoimmune diseases. *J Neuroimmunol* **191**, 8–15 (2007).
218. Yoshimoto, T., Bendelac, A., Hu-Li, J. & Paul, W. E. Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4<sup>+</sup>, NK1.1<sup>+</sup> T cells that promptly produce interleukin 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 11931–11934 (1995).
219. Mars, L. T. *et al.* Cutting edge: V alpha 14-J alpha 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice. *J Immunol* **168**, 6007–11 (2002).
220. Oishi, Y. *et al.* Selective reduction and recovery of invariant Valpha24JalphaQ T cell receptor T cells in correlation with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* **28**, 275–83 (2001).
221. Yang, J. Q. *et al.* Repeated alpha-galactosylceramide administration results in expansion of NK T cells and alleviates inflammatory dermatitis in MRL-lpr/lpr mice. *J Immunol* **171**, 4439–46 (2003).
222. Takeda, K. & Dennert, G. The development of autoimmunity in C57BL/6 lpr mice correlates with the disappearance of natural killer type 1-positive cells: evidence for their suppressive action on bone marrow stem cell proliferation, B cell immunoglobulin secretion, and autoimmune symptoms. *J Exp Med* **177**, 155–64 (1993).
223. Yang, J. Q. *et al.* Examining the role of CD1d and natural killer T cells in the development of nephritis in a genetically susceptible lupus model. *Arthritis Rheum* **56**, 1219–33 (2007).
224. Demoulin, T., Gachelin, G., Bequet, D. & Dormont, D. A biased Valpha24<sup>+</sup> T-cell repertoire leads to circulating NKT-cell defects in a multiple sclerosis patient at the onset of his disease. *Immunol Lett* **90**, 223–8 (2003).
225. Chiba, A., Kaieda, S., Oki, S., Yamamura, T. & Miyake, S. The involvement of V(alpha)14 natural killer T cells in the pathogenesis of arthritis in murine models. *Arthritis Rheum* **52**, 1941–8 (2005).



226. Wu, L. & Van Kaer, L. Natural killer T cells and autoimmune disease. *Curr Mol Med* **9**, 4–14 (2009).
227. Hammond, K. J. *et al.* alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp Med* **187**, 1047–56 (1998).
228. Beaudoin, L., Laloux, V., Novak, J., Lucas, B. & Lehuen, A. NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells. *Immunity* **17**, 725–36 (2002).
229. Wang, B., Geng, Y. B. & Wang, C. R. CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. *J Exp Med* **194**, 313–20 (2001).
230. Hong, S. *et al.* The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* **7**, 1052–6 (2001).
231. Naumov, Y. N. *et al.* Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13838–43 (2001).
232. Giaccone, G. *et al.* A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* **8**, 3702–9 (2002).
233. Nieda, M. *et al.* Therapeutic activation of Valpha24+Vbeta11+ NKT cells in human subjects results in highly coordinated secondary activation of acquired and innate immunity. *Blood* **103**, 383–9 (2004).
234. Ishikawa, E. *et al.* Dendritic cell maturation by CD11c- T cells and Valpha24+ natural killer T-cell activation by alpha-galactosylceramide. *Int J Cancer* **117**, 265–73 (2005).
235. Veldt, B. J. *et al.* Randomized placebo controlled phase I/II trial of alpha-galactosylceramide for the treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol* **47**, 356–65 (2007).
236. van den Heuvel, M. J., Garg, N., Van Kaer, L. & Haeryfar, S. M. NKT cell costimulation: experimental progress and therapeutic promise. *Trends Mol Med* **17**, 65–77 (2011).
237. Hashimoto, K., Hirai, M. & Kurosawa, Y. A gene outside the human MHC related to classical HLA class I genes. *Science* **269**, 693–5 (1995).
238. Chua, W. J. *et al.* Endogenous MHC-related protein 1 is transiently expressed on the plasma membrane in a conformation that activates mucosal-associated invariant T cells. *J Immunol* **186**, 4744–50 (2011).
239. Dusseaux, M. *et al.* Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* **117**, 1250–9 (2011).
240. Le Bourhis, L. *et al.* Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat Immunol* **11**, 701–8 (2010).
241. Martin, E. *et al.* Stepwise development of MAIT cells in mouse and human. *PLoS Biol* **7**, e54 (2009).
242. Treiner, E. *et al.* Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* **422**, 164–9 (2003).

243. Walker, L. J. *et al.* Human MAIT and CD8 $\alpha$  $\alpha$  cells develop from a pool of type-17 precommitted CD8 $^{+}$  T cells. *Blood* **119**, 422–33 (2012).
244. Guo, J. *et al.* Regulation of the TCR $\alpha$  repertoire by the survival window of CD4(+)CD8(+) thymocytes. *Nat Immunol* **3**, 469–76 (2002).
245. Croxford, J. L., Miyake, S., Huang, Y. Y., Shimamura, M. & Yamamura, T. Invariant V( $\alpha$ )19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat Immunol* **7**, 987–94 (2006).
246. Illes, Z., Shimamura, M., Newcombe, J., Oka, N. & Yamamura, T. Accumulation of V $\alpha$ 7.2-J $\alpha$ 33 invariant T cells in human autoimmune inflammatory lesions in the nervous system. *Int Immunol* **16**, 223–30 (2004).
247. Chiba, A. *et al.* Mucosal-associated invariant T cells promote inflammation and exacerbate disease in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum* **64**, 153–61 (2012).
248. Gold, M. C. *et al.* Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol* **8**, e1000407 (2010).
249. Kawachi, I., Maldonado, J., Strader, C. & Gilfillan, S. MR1-restricted V  $\alpha$  19i mucosal-associated invariant T cells are innate T cells in the gut lamina propria that provide a rapid and diverse cytokine response. *J Immunol* **176**, 1618–27 (2006).
250. Shimamura, M., Huang, Y. Y., Kobayashi, M. & Goji, H. Altered production of immunoregulatory cytokines by invariant V $\alpha$ 19 TCR-bearing cells dependent on the duration and intensity of TCR engagement. *Int Immunol* **21**, 179–85 (2009).
251. Hayday, A. C.  $[\gamma][\delta]$  cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* **18**, 975–1026 (2000).
252. Pawelec, G., Schaudt, K., Rehbein, A., Olive, D. & Buhning, H. J. Human T cell clones with  $\gamma/\delta$  and  $\alpha/\beta$  receptors are differently stimulated by monoclonal antibodies to CD2. *Cell Immunol* **129**, 385–93 (1990).
253. Van Houten, N., Mixter, P. F., Wolfe, J. & Budd, R. C. CD2 expression on murine intestinal intraepithelial lymphocytes is bimodal and defines proliferative capacity. *Int Immunol* **5**, 665–72 (1993).
254. Thedrez, A. *et al.* Self/non-self discrimination by human  $\gamma\delta$  T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev* **215**, 123–35 (2007).
255. Fuschiotti, P. *et al.* Analysis of the TCR  $\alpha$ -chain rearrangement profile in human T lymphocytes. *Mol Immunol* **44**, 3380–8 (2007).
256. Porcelli, S., Brenner, M. B. & Band, H. Biology of the human  $\gamma\delta$  T-cell receptor. *Immunol Rev* **120**, 137–83 (1991).
257. Holtmeier, W. *et al.* The TCR- $\delta$  repertoire in normal human skin is restricted and distinct from the TCR- $\delta$  repertoire in the peripheral blood. *J Invest Dermatol* **116**, 275–80 (2001).
258. Kabelitz, D. & Wesch, D. Features and functions of  $\gamma\delta$  T lymphocytes: focus on chemokines and their receptors. *Crit Rev Immunol* **23**, 339–70 (2003).
259. Marsal, J. *et al.* Involvement of CCL25 (TECK) in the generation of the murine small-intestinal CD8 $\alpha$   $\alpha$ +CD3 $^{+}$  intraepithelial lymphocyte compartment. *Eur J Immunol* **32**, 3488–97 (2002).
260. Beetz, S. *et al.* Innate immune functions of human  $\gamma\delta$  T cells. *Immunobiology* **213**, 173–82 (2008).

261. Hayes, S. M., Li, L. & Love, P. E. TCR signal strength influences alphabeta/gammadelta lineage fate. *Immunity* **22**, 583–93 (2005).
262. Lewis, J. M. *et al.* Selection of the cutaneous intraepithelial gammadelta+ T cell repertoire by a thymic stromal determinant. *Nat Immunol* **7**, 843–50 (2006).
263. Barbee, S. D. *et al.* Skint-1 is a highly specific, unique selecting component for epidermal T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 3330–5 (2011).
264. Hayes, S. M. & Love, P. E. A retrospective on the requirements for gammadelta T-cell development. *Immunol Rev* **215**, 8–14 (2007).
265. Jabeen, R., Chang, H. C., Goswami, R., Nutt, S. L. & Kaplan, M. H. The transcription factor PU.1 regulates gammadelta T cell homeostasis. *PLoS One* **6**, e22189 (2011).
266. Constant, P. *et al.* Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* **264**, 267–70 (1994).
267. Altincicek, B. *et al.* Cutting edge: human gamma delta T cells are activated by intermediates of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Immunol* **166**, 3655–8 (2001).
268. Gober, H. J. *et al.* Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J Exp Med* **197**, 163–8 (2003).
269. Wrobel, P. *et al.* Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition. *Scand J Immunol* **66**, 320–8 (2007).
270. Scotet, E. *et al.* Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* **22**, 71–80 (2005).
271. Russano, A. M. *et al.* CD1-restricted recognition of exogenous and self-lipid antigens by duodenal gammadelta+ T lymphocytes. *J Immunol* **178**, 3620–6 (2007).
272. Groh, V., Steinle, A., Bauer, S. & Spies, T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* **279**, 1737–40 (1998).
273. Xu, B. *et al.* Crystal structure of a gammadelta T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 2414–9 (2010).
274. Bonneville, M., O'Brien, R. L. & Born, W. K. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* **10**, 467–78 (2010).
275. Koizumi, H. *et al.* Expression of perforin and serine esterases by human gamma/delta T cells. *J Exp Med* **173**, 499–502 (1991).
276. Kabelitz, D., Wesch, D. & He, W. Perspectives of gammadelta T cells in tumor immunology. *Cancer Res* **67**, 5–8 (2007).
277. Oliaro, J. *et al.* Vgamma9Vdelta2 T cells use a combination of mechanisms to limit the spread of the pathogenic bacteria Brucella. *J Leukoc Biol* **77**, 652–60 (2005).
278. Garcia, V. E. *et al.* Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens. *J Immunol* **159**, 1328–35 (1997).
279. Spinozzi, F. *et al.* IL-4 is able to reverse the CD2-mediated negative apoptotic signal to CD4-CD8- alpha beta and/or gamma delta T lymphocytes. *Immunology* **86**, 379–84 (1995).

280. Jameson, J. & Havran, W. L. Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing. *Immunol Rev* **215**, 114–22 (2007).
281. Marx, S., Wesch, D. & Kabelitz, D. Activation of human gamma delta T cells by Mycobacterium tuberculosis and Daudi lymphoma cells: differential regulatory effect of IL-10 and IL-12. *J Immunol* **158**, 2842–8 (1997).
282. Behr, C. *et al.* Plasmodium falciparum stimuli for human gammadelta T cells are related to phosphorylated antigens of mycobacteria. *Infect Immun* **64**, 2892–6 (1996).
283. Pitard, V. *et al.* Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood* **112**, 1317–1324 (2008).
284. Gerber, D. J. *et al.* IL-4-producing gamma delta T cells that express a very restricted TCR repertoire are preferentially localized in liver and spleen. *J Immunol* **163**, 3076–82 (1999).
285. Azuara, V., Levraud, J. P., Lembezat, M. P. & Pereira, P. A novel subset of adult gamma delta thymocytes that secretes a distinct pattern of cytokines and expresses a very restricted T cell receptor repertoire. *Eur J Immunol* **27**, 544–53 (1997).
286. Kreslavsky, T. *et al.* TCR-inducible PLZF transcription factor required for innate phenotype of a subset of gammadelta T cells with restricted TCR diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12453–8 (2009).
287. Seaman, M. S., Perarnau, B., Lindahl, K. F., Lemonnier, F. A. & Forman, J. Response to Listeria monocytogenes in mice lacking MHC class Ia molecules. *J Immunol* **162**, 5429–36 (1999).
288. Pamer, E. G., Wang, C. R., Flaherty, L., Lindahl, K. F. & Bevan, M. J. H-2M3 presents a Listeria monocytogenes peptide to cytotoxic T lymphocytes. *Cell* **70**, 215–23 (1992).
289. Seaman, M. S., Wang, C. R. & Forman, J. MHC class Ib-restricted CTL provide protection against primary and secondary Listeria monocytogenes infection. *J Immunol* **165**, 5192–201 (2000).
290. Das, G., Sheridan, S. & Janeway, C. A. The source of early IFN-gamma that plays a role in Th1 priming. *J Immunol* **167**, 2004–10 (2001).
291. Kerksiek, K. M., Busch, D. H., Pilip, I. M., Allen, S. E. & Pamer, E. G. H2-M3-restricted T cells in bacterial infection: rapid primary but diminished memory responses. *J Exp Med* **190**, 195–204 (1999).
292. Berg, R. E. *et al.* Positive selection of an H2-M3 restricted T cell receptor. *Immunity* **11**, 33–43 (1999).
293. Chiu, N. M. *et al.* The selection of M3-restricted T cells is dependent on M3 expression and presentation of N-formylated peptides in the thymus. *J Exp Med* **190**, 1869–78 (1999).
294. Urdahl, K. B., Sun, J. C. & Bevan, M. J. Positive selection of MHC class Ib-restricted CD8(+) T cells on hematopoietic cells. *Nat Immunol* **3**, 772–9 (2002).
295. Colmone, A. & Wang, C. R. H2-M3-restricted T cell response to infection. *Microbes Infect* **8**, 2277–83 (2006).
296. Muller, J. R., Waldmann, T. A. & Dubois, S. Selective dependence of H2-M3-restricted CD8 responses on IL-15. *J Immunol* **188**, 2575–82 (2012).

297. Traggiai, E. *et al.* Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* **304**, 104–7 (2004).
298. Li, W. *et al.* An alternate pathway for CD4 T cell development: thymocyte-expressed MHC class II selects a distinct T cell population. *Immunity* **23**, 375–86 (2005).
299. Choi, E. Y. *et al.* Thymocyte-thymocyte interaction for efficient positive selection and maturation of CD4 T cells. *Immunity* **23**, 387–96 (2005).
300. Li, W. *et al.* The SLAM-associated protein signaling pathway is required for development of CD4<sup>+</sup> T cells selected by homotypic thymocyte interaction. *Immunity* **27**, 763–74 (2007).
301. Li, W. *et al.* Thymic selection pathway regulates the effector function of CD4 T cells. *J Exp Med* **204**, 2145–57 (2007).
302. Lee, Y. J. *et al.* Generation of PLZF<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells via MHC class II-dependent thymocyte-thymocyte interaction is a physiological process in humans. *J Exp Med* **207**, 237–46 (2010).
303. Thulesen, S. *et al.* Superantigens are presented by and activate thymocytes from infants. *Exp Clin Immunogenet* **16**, 226–33 (1999).
304. Cheroutre, H., Lambolez, F. & Mucida, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Rev Immunol* **11**, 445–56 (2011).
305. Leishman, A. J. *et al.* Precursors of functional MHC class I- or class II-restricted CD8 $\alpha$  $\alpha$ (<sup>+</sup>) T cells are positively selected in the thymus by agonist self-peptides. *Immunity* **16**, 355–64 (2002).
306. Ma, L. J., Acero, L. F., Zal, T. & Schluns, K. S. Trans-presentation of IL-15 by intestinal epithelial cells drives development of CD8 $\alpha$  $\alpha$  IELs. *J Immunol* **183**, 1044–54 (2009).
307. Atherly, L. O. *et al.* The Tec family tyrosine kinases Itk and Rlk regulate the development of conventional CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity* **25**, 79–91 (2006).
308. Szabo, S. J. *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655–69 (2000).
309. Broussard, C. *et al.* Altered development of CD8<sup>+</sup> T cell lineages in mice deficient for the Tec kinases Itk and Rlk. *Immunity* **25**, 93–104 (2006).
310. Berg, L. J. Signalling through TEC kinases regulates conventional versus innate CD8(<sup>+</sup>) T-cell development. *Nat Rev Immunol* **7**, 479–85 (2007).
311. Weinreich, M. A., Odumade, O. A., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* **11**, 709–16 (2010).
312. Qi, Q. *et al.* Enhanced development of CD4<sup>+</sup> gammadelta T cells in the absence of Itk results in elevated IgE production. *Blood* **114**, 564–71 (2009).
313. Verykokakis, M., Boos, M. D., Bendelac, A. & Kee, B. L. SAP protein-dependent natural killer T-like cells regulate the development of CD8(<sup>+</sup>) T cells with innate lymphocyte characteristics. *Immunity* **33**, 203–15 (2010).
314. Lee, Y. J., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. Alternative memory in the CD8 T cell lineage. *Trends Immunol* **32**, 50–6 (2011).



315. Fischer, A. Severe combined immunodeficiencies (SCID). *Clin Exp Immunol* **122**, 143–9 (2000).
316. de Saint Basile, G., Menasche, G. & Latour, S. Inherited defects causing hemophagocytic lymphohistiocytic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* **1246**, 64–76
317. Skare, J. C., Sullivan, J. L. & Milunsky, A. Mapping the mutation causing the X-linked lymphoproliferative syndrome in relation to restriction fragment length polymorphisms on Xq. *Hum Genet* **82**, 349–53 (1989).
318. Skare, J. C. *et al.* Linkage analysis of seven kindreds with the X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP) confirms that the XLP locus is near DXS42 and DXS37. *Hum Genet* **82**, 354–8 (1989).
319. Sayos, J. *et al.* The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* **395**, 462–9 (1998).
320. Coffey, A. J. *et al.* Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet* **20**, 129–35 (1998).
321. Latour, S. & Veillette, A. The SAP family of adaptors in immune regulation. *Semin Immunol* **16**, 409–19 (2004).
322. Veillette, A., Dong, Z., Perez-Quintero, L. A., Zhong, M. C. & Cruz-Munoz, M. E. Importance and mechanism of ‘switch’ function of SAP family adapters. *Immunol Rev* **232**, 229–39 (2009).
323. Latour, S. *et al.* Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat Cell Biol* **5**, 149–54 (2003).
324. Chan, B. *et al.* SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat Cell Biol* **5**, 155–60 (2003).
325. Chen, R., Latour, S., Shi, X. & Veillette, A. Association between SAP and FynT: Inducible SH3 domain-mediated interaction controlled by engagement of the SLAM receptor. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5559–5568 (2006).
326. Ma, C. S., Nichols, K. E. & Tangye, S. G. Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu Rev Immunol* **25**, 337–79 (2007).
327. Nichols, K. E. *et al.* Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13765–70 (1998).
328. Nagy, N. *et al.* SH2D1A and SLAM protein expression in human lymphocytes and derived cell lines. *Int J Cancer* **88**, 439–47 (2000).
329. Williams, H. *et al.* Analysis of immune activation and clinical events in acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis* **190**, 63–71 (2004).
330. Nichols, K. E. *et al.* Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nat Med* **11**, 340–5 (2005).
331. Dupre, L. *et al.* SAP controls the cytolytic activity of CD8<sup>+</sup> T cells against EBV-infected cells. *Blood* **105**, 4383–9 (2005).
332. Sharifi, R. *et al.* SAP mediates specific cytotoxic T-cell functions in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* **103**, 3821–7 (2004).

333. Parolini, S. *et al.* X-linked lymphoproliferative disease. 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J Exp Med* **192**, 337–46 (2000).
334. Hislop, A. D. *et al.* Impaired Epstein-Barr virus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell function in X-linked lymphoproliferative disease is restricted to SLAM family-positive B-cell targets. *Blood* **116**, 3249–57 (2010).
335. Bloch-Queyrat, C. *et al.* Regulation of natural cytotoxicity by the adaptor SAP and the Src-related kinase Fyn. *J Exp Med* **202**, 181–92 (2005).
336. Dong, Z. *et al.* Essential function for SAP family adaptors in the surveillance of hematopoietic cells by natural killer cells. *Nat Immunol* **10**, 973–80 (2009).
337. Ma, C. S. *et al.* Selective generation of functional somatically mutated IgM<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, but not Ig isotype-switched, memory B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Clin Invest* **116**, 322–33 (2006).
338. Ma, C. S. *et al.* Impaired humoral immunity in X-linked lymphoproliferative disease is associated with defective IL-10 production by CD4<sup>+</sup> T cells. *J Clin Invest* **115**, 1049–59 (2005).
339. Sumegi, J. *et al.* Correlation of mutations of the SH2D1A gene and epstein-barr virus infection with clinical phenotype and outcome in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* **96**, 3118–25 (2000).
340. Cannons, J. L. *et al.* SAP regulates T cell-mediated help for humoral immunity by a mechanism distinct from cytokine regulation. *J Exp Med* **203**, 1551–65 (2006).
341. Qi, H., Cannons, J. L., Klauschen, F., Schwartzberg, P. L. & Germain, R. N. SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* **455**, 764–9 (2008).
342. Cannons, J. L. *et al.* Optimal germinal center responses require a multistage T cell:B cell adhesion process involving integrins, SLAM-associated protein, and CD84. *Immunity* **32**, 253–65 (2010).
343. Chen, G. *et al.* Increased proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells in SAP-deficient mice is associated with impaired activation-induced cell death. *Eur J Immunol* **37**, 663–74 (2007).
344. Nagy, N. *et al.* The proapoptotic function of SAP provides a clue to the clinical picture of X-linked lymphoproliferative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 11966–71 (2009).
345. Snow, A. L. *et al.* Restimulation-induced apoptosis of T cells is impaired in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by SAP deficiency. *J Clin Invest* **119**, 2976–89 (2009).
346. Rigaud, S. *et al.* XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* **444**, 110–4 (2006).
347. Pachlopnik Schmid, J. *et al.* Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP deficiency). *Blood* **117**, 1522–9 (2011).
348. Savill, J. & Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**, 784–8 (2000).



349. Stennicke, H. R. & Salvesen, G. S. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* **1387**, 17–31 (1998).
350. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. & Horvitz, H. R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**, 641–52 (1993).
351. Fuentes-Prior, P. & Salvesen, G. S. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* **384**, 201–32 (2004).
352. Wolf, B. B. & Green, D. R. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* **274**, 20049–52 (1999).
353. Van de Craen, M., Declercq, W., Van den brande, I., Fiers, W. & Vandenabeele, P. The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ* **6**, 1117–24 (1999).
354. Boatright, K. M. & Salvesen, G. S. Caspase activation. *Biochem Soc Symp* 233–42 (2003).
355. Fischer, U., Janicke, R. U. & Schulze-Osthoff, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* **10**, 76–100 (2003).
356. Erlacher, M. *et al.* BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* **106**, 4131–8 (2005).
357. Riedl, S. J. & Salvesen, G. S. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 405–13 (2007).
358. Armitage, R. J. Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* **6**, 407–13 (1994).
359. French, L. E. & Tschopp, J. Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ* **10**, 117–23 (2003).
360. Wajant, H. Death receptors. *Essays Biochem* **39**, 53–71 (2003).
361. Ogasawara, J., Suda, T. & Nagata, S. Selective apoptosis of CD4+CD8+ thymocytes by the anti-Fas antibody. *J Exp Med* **181**, 485–91 (1995).
362. Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. & Nagata, S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* **75**, 1169–78 (1993).
363. Oshimi, K. Lymphoproliferative disorders of natural killer cells. *Int J Hematol* **63**, 279–90 (1996).
364. Sprick, M. R. *et al.* Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *Embo J* **21**, 4520–30 (2002).
365. Bodmer, J. L. *et al.* TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol* **2**, 241–3 (2000).
366. Sprick, M. R. *et al.* FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* **12**, 599–609 (2000).
367. Kischkel, F. C. *et al.* Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* **12**, 611–20 (2000).

368. Lenardo, M. *et al.* Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* **17**, 221–53 (1999).
369. Ashwell, J. D., Cunningham, R. E., Noguchi, P. D. & Hernandez, D. Cell growth cycle block of T cell hybridomas upon activation with antigen. *J Exp Med* **165**, 173–94 (1987).
370. Kneitz, B., Herrmann, T., Yonehara, S. & Schimpl, A. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. *Eur J Immunol* **25**, 2572–7 (1995).
371. Suzuki, H. *et al.* Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* **268**, 1472–6 (1995).
372. Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K. M. & Krammer, P. H. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* **373**, 438–41 (1995).
373. Schmitz, I. *et al.* An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *J Immunol* **171**, 2930–6 (2003).
374. Bosque, A., Marzo, I., Naval, J. & Anel, A. Apoptosis by IL-2 deprivation in human CD8<sup>+</sup> T cell blasts predominates over death receptor ligation, requires Bim expression and is associated with Mcl-1 loss. *Mol Immunol* **44**, 1446–53 (2007).
375. Bagnoli, M., Canevari, S. & Mezzanzanica, D. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signalling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 210–3 (2010).
376. Degli-Esposti, M. A. *et al.* Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* **186**, 1165–70 (1997).
377. Degli-Esposti, M. A. *et al.* The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* **7**, 813–20 (1997).
378. Crook, N. E., Clem, R. J. & Miller, L. K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* **67**, 2168–74 (1993).
379. Fulda, S. & Vucic, D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 109–24 (2012).
380. Salvesen, G. S. & Duckett, C. S. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 401–10 (2002).
381. LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G. & MacKenzie, A. E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* **17**, 3247–59 (1998).
382. Eckelman, B. P., Salvesen, G. S. & Scott, F. L. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* **7**, 988–94 (2006).
383. Srinivasula, S. M. *et al.* A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**, 112–6 (2001).
384. Shiozaki, E. N. *et al.* Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* **11**, 519–27 (2003).
385. Huang, Y. *et al.* Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* **104**, 781–90 (2001).
386. Chai, J. *et al.* Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* **104**, 769–80 (2001).

387. Riedl, S. J. *et al.* Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* **104**, 791–800 (2001).
388. Suzuki, Y., Nakabayashi, Y. & Takahashi, R. Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 8662–7 (2001).
389. Deveraux, Q. L. *et al.* Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *Embo J* **18**, 5242–51 (1999).
390. Schile, A. J., Garcia-Fernandez, M. & Steller, H. Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity. *Genes Dev* **22**, 2256–66 (2008).
391. Choi, Y. E. *et al.* The E3 ubiquitin ligase cIAP1 binds and ubiquitinates caspase-3 and -7 via unique mechanisms at distinct steps in their processing. *J Biol Chem* **284**, 12772–82 (2009).
392. Hu, S. & Yang, X. Cellular inhibitor of apoptosis 1 and 2 are ubiquitin ligases for the apoptosis inducer Smac/DIABLO. *J Biol Chem* **278**, 10055–60 (2003).
393. Claveria, C., Caminero, E., Martinez, A. C., Campuzano, S. & Torres, M. GH3, a novel proapoptotic domain in *Drosophila* Grim, promotes a mitochondrial death pathway. *Embo J* **21**, 3327–36 (2002).
394. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33–42 (2000).
395. Verhagen, A. M. *et al.* Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43–53 (2000).
396. Suzuki, Y. *et al.* A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **8**, 613–21 (2001).
397. Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M. & Ashwell, J. D. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* **288**, 874–7 (2000).
398. Silke, J. *et al.* Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16182–7 (2005).
399. Zheng, C., Kabaleeswaran, V., Wang, Y., Cheng, G. & Wu, H. Crystal structures of the TRAF2: cIAP2 and the TRAF1: TRAF2: cIAP2 complexes: affinity, specificity, and regulation. *Mol. Cell* **38**, 101–113 (2010).
400. Csomos, R. A., Brady, G. F. & Duckett, C. S. Enhanced cytoprotective effects of the inhibitor of apoptosis protein cellular IAP1 through stabilization with TRAF2. *J. Biol. Chem.* **284**, 20531–20539 (2009).
401. Sanna, M. G., Duckett, C. S., Richter, B. W., Thompson, C. B. & Ulevitch, R. J. Selective activation of JNK1 is necessary for the anti-apoptotic activity of hILP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6015–20 (1998).
402. Sanna, M. G. *et al.* ILPIP, a novel anti-apoptotic protein that enhances XIAP-mediated activation of JNK1 and protection against apoptosis. *J Biol Chem* **277**, 30454–62 (2002).

403. Birkey Reffey, S., Wurthner, J. U., Parks, W. T., Roberts, A. B. & Duckett, C. S. X-linked inhibitor of apoptosis protein functions as a cofactor in transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.* **276**, 26542–26549 (2001).
404. Yamaguchi, K. *et al.* XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *Embo J* **18**, 179–87 (1999).
405. Van Themsche, C., Chaudhry, P., Leblanc, V., Parent, S. & Asselin, E. XIAP gene expression and function is regulated by autocrine and paracrine TGF-beta signaling. *Mol Cancer* **9**, 216 (2010).
406. Burstein, E. *et al.* A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1. *Embo J* **23**, 244–54 (2004).
407. Varfolomeev, E. *et al.* c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. *J. Biol. Chem.* **283**, 24295–24299 (2008).
408. Varfolomeev, E. *et al.* IAP antagonists induce autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB activation, and TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **131**, 669–81 (2007).
409. Vince, J. E. *et al.* IAP antagonists target cIAP1 to induce TNFalpha-dependent apoptosis. *Cell* **131**, 682–93 (2007).
410. Lu, M. *et al.* XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Mol Cell* **26**, 689–702 (2007).
411. de Bie, P. *et al.* Characterization of COMMD protein-protein interactions in NF-kappaB signalling. *Biochem J* **398**, 63–71 (2006).
412. Krieg, A. *et al.* XIAP mediates NOD signaling via interaction with RIP2. *Proc Natl Acad Sci US A* **106**, 14524–9 (2009).
413. Damgaard, R. B. *et al.* The Ubiquitin Ligase XIAP Recruits LUBAC for NOD2 Signaling in Inflammation and Innate Immunity. *Molecular cell* (2012).doi:10.1016/j.molcel.2012.04.014
414. Bertrand, M. J. *et al.* Cellular inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 are required for innate immunity signaling by the pattern recognition receptors NOD1 and NOD2. *Immunity* **30**, 789–801 (2009).
415. Tseng, P. H. *et al.* Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nat Immunol* **11**, 70–5 (2010).
416. Takeuchi, O. & Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* **140**, 805–820 (2010).
417. Mao, A.-P. *et al.* Virus-triggered ubiquitination of TRAF3/6 by cIAP1/2 is essential for induction of interferon-beta (IFN-beta) and cellular antiviral response. *J. Biol. Chem.* **285**, 9470–9476 (2010).
418. Harlin, H., Reffey, S. B., Duckett, C. S., Lindsten, T. & Thompson, C. B. Characterization of XIAP-deficient mice. *Mol Cell Biol* **21**, 3604–8 (2001).
419. Olayioye, M. A. *et al.* XIAP-deficiency leads to delayed lobuloalveolar development in the mammary gland. *Cell Death Differ* **12**, 87–90 (2005).

420. Rumble, J. M. *et al.* Phenotypic differences between mice deficient in XIAP and SAP, two factors targeted in X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP). *Cell Immunol* **259**, 82–9 (2009).
421. Conze, D. B. *et al.* Posttranscriptional downregulation of c-IAP2 by the ubiquitin protein ligase c-IAP1 in vivo. *Mol Cell Biol* **25**, 3348–56 (2005).
422. Potts, P. R., Singh, S., Knezek, M., Thompson, C. B. & Deshmukh, M. Critical function of endogenous XIAP in regulating caspase activation during sympathetic neuronal apoptosis. *J Cell Biol* **163**, 789–99 (2003).
423. Potts, M. B., Vaughn, A. E., McDonough, H., Patterson, C. & Deshmukh, M. Reduced Apaf-1 levels in cardiomyocytes engage strict regulation of apoptosis by endogenous XIAP. *J Cell Biol* **171**, 925–30 (2005).
424. Rumble, J. M. *et al.* Apoptotic sensitivity of murine IAP-deficient cells. *Biochem J* **415**, 21–5 (2008).
425. Bauler, L. D., Duckett, C. S. & O’Riordan, M. X. XIAP regulates cytosol-specific innate immunity to *Listeria* infection. *PLoS Pathog* **4**, e1000142 (2008).
426. Bratton, S. B., Lewis, J., Butterworth, M., Duckett, C. S. & Cohen, G. M. XIAP inhibition of caspase-3 preserves its association with the Apaf-1 apoptosome and prevents CD95- and Bax-induced apoptosis. *Cell Death Differ* **9**, 881–92 (2002).
427. Dinges, M. M., Orwin, P. M. & Schlievert, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 16–34, table of contents (2000).
428. Chae, H. J. *et al.* Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacol Res* **42**, 373–81 (2000).
429. Makhov, P. *et al.* Zinc chelation induces rapid depletion of the X-linked inhibitor of apoptosis and sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* **15**, 1745–51 (2008).
430. Shaknovich, R. *et al.* The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis. *Mol Cell Biol* **18**, 5533–45 (1998).
431. Bernardo, M. V., Yelo, E., Gimeno, L., Campillo, J. A. & Parrado, A. Identification of apoptosis-related PLZF target genes. *Biochem Biophys Res Commun* **359**, 317–22 (2007).
432. Cheung, M. *et al.* The promyelocytic leukemia zinc-finger gene, PLZF, is frequently downregulated in malignant mesothelioma cells and contributes to cell survival. *Oncogene* **29**, 1633–40 (2010).
433. Long, H. M., Taylor, G. S. & Rickinson, A. B. Immune defence against EBV and EBV-associated disease. *Curr Opin Immunol* **23**, 258–64 (2011).
434. Metelitsa, L. S. *et al.* Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J. Immunol.* **167**, 3114–3122 (2001).
435. Hogan, A. E. *et al.* Activation of human invariant natural killer T cells with a thioglycoside analogue of  $\alpha$ -galactosylceramide. *Clin. Immunol.* **140**, 196–207 (2011).
436. Penack, O. *et al.* CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. *Leukemia* **19**, 835–40 (2005).



437. Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. & Reed, J. C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300–304 (1997).
438. Paulsen, M. *et al.* Interaction with XIAP prevents full caspase-3/-7 activation in proliferating human T lymphocytes. *Eur J Immunol* **38**, 1979–87 (2008).
439. Levkau, B. *et al.* xIAP induces cell-cycle arrest and activates nuclear factor-kappaB : new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells. *Circ Res* **88**, 282–90 (2001).
440. Carson, W. E. *et al.* A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest* **99**, 937–43 (1997).
441. Malamut, G. *et al.* IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. *J. Clin. Invest.* **120**, 2131–2143 (2010).
442. Kotevski, A., Cook, W. D., Vaux, D. L. & Callus, B. A. Identification of an Xiap-like pseudogene on mouse chromosome 7. *PLoS One* **4**, e8078 (2009).
443. Teachey, D. T. New advances in the diagnosis and treatment of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Curr. Opin. Pediatr.* **24**, 1–8 (2012).
444. Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D. & Staudt, L. M. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* **276**, 589–592 (1997).
445. He, X., Park, K. & Kappes, D. J. The role of ThPOK in control of CD4/CD8 lineage commitment. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 295–320 (2010).
446. Maeda, T. *et al.* Regulation of B versus T lymphoid lineage fate decision by the proto-oncogene LRF. *Science* **316**, 860–866 (2007).
447. Martin, P. J., Delmotte, M.-H., Formstecher, P. & Lefebvre, P. PLZF is a negative regulator of retinoic acid receptor transcriptional activity. *Nucl. Recept.* **1**, 6 (2003).
448. Barna, M., Hawe, N., Niswander, L. & Pandolfi, P. P. Plzf regulates limb and axial skeletal patterning. *Nat. Genet.* **25**, 166–172 (2000).
449. Avantaggiato, V. *et al.* Developmental analysis of murine Promyelocyte Leukemia Zinc Finger (PLZF) gene expression: implications for the neuromeric model of the forebrain organization. *J. Neurosci.* **15**, 4927–4942 (1995).
450. Costoya, J. A. *et al.* Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat. Genet.* **36**, 653–659 (2004).
451. Felicetti, F. *et al.* Role of PLZF in melanoma progression. *Oncogene* **23**, 4567–4576 (2004).
452. Rho, S. B., Chung, B. M. & Lee, J.-H. TIMP-1 regulates cell proliferation by interacting with the ninth zinc finger domain of PLZF. *J. Cell. Biochem.* **101**, 57–67 (2007).
453. Rice, K. L. *et al.* Comprehensive genomic screens identify a role for PLZF-RARalpha as a positive regulator of cell proliferation via direct regulation of c-MYC. *Blood* **114**, 5499–5511 (2009).
454. Qi, Q. *et al.* A unique role for ITK in survival of invariant NKT cells associated with the p53-dependent pathway in mice. *J. Immunol.* **188**, 3611–3619 (2012).

455. Parrado, A. *et al.* The promyelocytic leukemia zinc finger protein down-regulates apoptosis and expression of the proapoptotic BID protein in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 1898–1903 (2004).
456. McConnell, M. J. *et al.* Growth suppression by acute promyelocytic leukemia-associated protein PLZF is mediated by repression of c-myc expression. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 9375–9388 (2003).
457. van Gisbergen, K. P. J. M. *et al.* Mouse Hobit is a homolog of the transcriptional repressor Blimp-1 that regulates NKT cell effector differentiation. *Nat. Immunol.* **13**, 864–871 (2012).
458. Constantinides, M. G., Picard, D., Savage, A. K. & Bendelac, A. A naive-like population of human CD1d-restricted T cells expressing intermediate levels of promyelocytic leukemia zinc finger. *J Immunol* **187**, 309–15 (2011).
459. Lim, W. H., Kireta, S., Russ, G. R. & Coates, P. T. Human plasmacytoid dendritic cells regulate immune responses to Epstein-Barr virus (EBV) infection and delay EBV-related mortality in humanized NOD-SCID mice. *Blood* **109**, 1043–50 (2007).
460. Rohr, J. *et al.* Atypical familial hemophagocytic lymphohistiocytosis due to mutations in UNC13D and STXBP2 overlaps with primary immunodeficiency diseases. *Haematologica* **95**, 2080–7 (2010).
461. Marsh, R. A. *et al.* Patients with X-linked lymphoproliferative disease due to BIRC4 mutation have normal invariant natural killer T-cell populations. *Clin Immunol* **132**, 116–23 (2009).
462. Marsh, R. A. *et al.* A rapid flow cytometric screening test for X-linked lymphoproliferative disease due to XIAP deficiency. *Cytometry B Clin Cytom* **76**, 334–44 (2009).
463. Nieuwenhuis, E. E. *et al.* Cd1d-dependent regulation of bacterial colonization in the intestine of mice. *J Clin Invest* **119**, 1241–50 (2009).
464. Olszak, T. *et al.* Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* **336**, 489–93 (2012).
465. Nourse, J. P., Jones, K. & Gandhi, M. K. Epstein-Barr Virus-related post-transplant lymphoproliferative disorders: pathogenetic insights for targeted therapy. *Am. J. Transplant.* **11**, 888–895 (2011).
466. Cesarman, E. Gammaherpesvirus and lymphoproliferative disorders in immunocompromised patients. *Cancer Lett.* **305**, 163–174 (2011).
467. Palendira, U. *et al.* Expansion of somatically reverted memory CD8<sup>+</sup> T cells in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by selective pressure from Epstein-Barr virus. *J. Exp. Med.* **209**, 913–924 (2012).
468. Lakhan, S. E. & Kirchgessner, A. Gut microbiota and sirtuins in obesity-related inflammation and bowel dysfunction. *J Transl Med* **9**, 202 (2011).
469. Motohashi, S. *et al.* A phase I study of in vitro expanded natural killer T cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **12**, 6079–86 (2006).
470. Kunii, N. *et al.* Combination therapy of in vitro-expanded natural killer T cells and alpha-galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma. *Cancer Sci* **100**, 1092–8 (2009).



471. Rubio, M.-T. *et al.* Early post-transplant donor-derived invariant natural killer T cell recovery predicts the occurrence of acute graft-versus-host disease and overall survival. *Blood* (2012).doi:10.1182/blood-2012-01-404673
472. Najera Chuc, A. E., Cervantes, L. A., Retiguin, F. P., Ojeda, J. V. & Maldonado, E. R. Low number of invariant NKT cells is associated with poor survival in acute myeloid leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* (2012).at <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22692855](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22692855)>
473. Chang, D. H. *et al.* Enhancement of ligand-dependent activation of human natural killer T cells by lenalidomide: therapeutic implications. *Blood* **108**, 618–21 (2006).
474. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184**, 39–51 (1995).

## VIII. ARTICLE SOUMIS A PUBLICATION :

### **Innate-like invariant iNKT and MAIT cells exhibit a PLZF-dependent pro-apoptotic propensity that is counterbalanced by XIAP**

Stéphane Gérard<sup>1,2</sup>, Sophie Sibénil<sup>1,2</sup>, Emmanuel Martin<sup>1</sup>, Christelle Lenoir<sup>1</sup>, Claire Aguilar<sup>1,2</sup>, Capucine Picard<sup>2,3,4</sup>, Olivier Lantz<sup>5</sup>, Alain Fischer<sup>1,2,6</sup> and Sylvain Latour<sup>1,2</sup>

From the <sup>1</sup>Unité INSERM 768, Laboratoire du Développement Normal et Pathologique du Système Immunitaire, Hôpital Necker Enfants-Malades, Paris, France; <sup>2</sup>Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Paris, France; <sup>3</sup>Centre d'étude des Déficiets Immunitaires, Hôpital Necker Enfants-Malades, AP-HP, Paris, France; <sup>4</sup>Unité INSERM 980, Faculté Necker Enfants-Malades, Paris, France; <sup>5</sup>Unité INSERM U932, Institut Curie, Paris, France; <sup>6</sup>Unité d'Immunologie et Hématologie Pédiatrique, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Hôpital Necker Enfants-Malades, Paris, France

**CORRESPONDENCE:** Sylvain Latour, Unité INSERM 768, 149 rue de Sèvres, Hôpital Necker Enfants-Malades, Paris, France; Tel : 33 1 44 49 50 51 FAX : 33 1 42 73 06 40 email:sylvain.latour@inserm.fr

**RUNNING TITLE:** Regulation of the pro-apoptotic phenotype of invariant T cells by PLZF and XIAP

## **ABSTRACT**

Innate immune T cells such as invariant natural killer T cells (iNKT) and mucosal-associated invariant T cells (MAIT) are important effectors of early steps of immune responses. We herein report that iNKT and MAIT cells exhibit a high susceptibility to apoptosis that is not observed with conventional T cells. Elevated expression of the caspases 3 and 7 in iNKT cells account for their pro-apoptotic phenotype, which is counterbalanced by XIAP an inhibitor of apoptosis. This pro-apoptotic phenotype is dependent of the expression of the transcription factor PLZF. Conversely, over expression of PLZF in conventional T cells leads to a pro-apoptotic phenotype. Our findings identify a previously unknown pathway controlling innate T cell homeostasis depending on XIAP and PLZF.

## INTRODUCTION

Invariant natural killer T (iNKT) lymphocytes represent a peculiar T cell-lineage that differ from conventional T cells by their development, function, and ligands they recognize<sup>1</sup>. In humans, iNKT cells express an invariant (or semi invariant in mice) TCR made of the V $\alpha$ 24/J $\alpha$ 18/V $\beta$ 11 rearrangements, which recognizes glycosphingolipids from foreign and self origin presented by the MHC class I monomorphic molecule CD1d<sup>2</sup>. iNKT precursors are positively selected in the thymus by double-positive thymocytes expressing CD1d and during development, acquire an activated-memory phenotype<sup>1</sup>. Several pathways required for the development of iNKT cell but not of conventional T cells have been identified and characterized<sup>3</sup>. These include the SLAM family receptors, the SLAM-associated protein (SAP) and transcription factors such as NF- $\kappa$ B, Egr2, HEB and PLZF. Functionally, iNKT cells are considered as innate-like T lymphocytes with an immunoregulatory potential. When activated, they rapidly release large amounts of T helper (Th) type 1 (Th1), Th2 and Th17 cytokines and chemokines that influence immune responses. Based on these unique features, iNKT cells have been proposed to play an important role in the initiation and the regulation of immune responses at the interface between innate and adaptive immunity. Accordingly, many studies in mice have demonstrated their involvement in a variety of immunopathological conditions, confirming their broad role, while their therapeutic potential is considered in humans<sup>1</sup>. Recently, a second invariant T cell subpopulation, the mucosal associated invariant T (MAIT) cells was identified both in humans and mice<sup>4,5</sup>. These cells express a semi-invariant TCR made of V $\alpha$ 7.2/J $\alpha$ 33 rearrangements and share with iNKT cells a number of developmental, functional and phenotypical features that lead to consider MAIT cells also as innate-like T cells<sup>4,6,7</sup>.

Several conditions have been reported to be associated with a defect in iNKT cells, hence providing an insight into their possible functions in humans. It is however not known whether these defects precede the development of the disease or are a consequence of it<sup>1,8</sup>. Primary immunodeficiencies provide more obvious clues to the biology of human iNKT cells. Indeed, a number of genetic diseases including defects in *SH2D1A*, *ITK*, *XIAP* and *WASP* cause either defective differentiation or survival of iNKT cells<sup>9-13</sup>. With the help of their murine counterpart models, the investigation of several of these conditions has revealed important pathways involved in the development of iNKT cells.

The X-linked lymphoproliferative (XLP) syndrome was the first identified inherited immunodeficiency associated with an iNKT cell defect. The main clinical feature of XLP is a peculiar susceptibility to Epstein-Barr virus (EBV) infection, subsequent hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and hypogammaglobunemia<sup>14,15</sup>. On a molecular basis, XLP is divided into two distinct diseases, XLP type 1 (XLP-1) and XLP type 2 (XLP-2) respectively caused by mutations in *SH2D1A* (also named *SAP*) and *XIAP* (also denoted as *BIRC4*), respectively<sup>9,16-18</sup>. The *SH2D1A* gene product, the SLAM-associated protein (SAP) is a small adaptor that couples SLAM family receptors to downstream signaling pathways. In the absence of SAP, CD1d-restricted iNKT cell development is blocked in the thymus at the positive selection step<sup>19</sup>. The *XIAP* gene product, the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) is known to be a potent physiological inhibitor of caspases 3, 7 and 9<sup>20,21</sup>. In addition to its anti-apoptotic activity, XIAP is also involved in other signaling pathways including copper metabolism, activation of the NF- $\kappa$ B and MAP kinase pathways and TGF- $\beta$ -receptor, BMP-receptor and NOD2-receptor signaling<sup>22,23</sup>. Until now, the mechanism of the depletion of iNKT cells in humans with a XIAP deficiency was unknown.

Here, we report that iNKT and MAIT cells are characterized by a high propensity to apoptosis when compared with conventional T cells revealing a novel feature associated to these cells. This pro-apoptotic phenotype is exacerbated in the absence of XIAP expression and patients with a XIAP deficiency exhibited low numbers of iNKT and MAIT cells. Sensitivity to apoptosis was found to be directed by the expression of the transcription factor PLZF. Thus, a XIAP and a PLZF-dependent pathway reciprocally control survival/death of these innate-like immune T cells.

## RESULTS

### Reduction of iNKT cell numbers in XIAP-deficient patients

We previously reported that blood iNKT cell counts were low in six XIAP-deficient patients<sup>9</sup>. We extended these data to the study of newly identified patients with XIAP-deficiency<sup>14</sup> and compared them with SAP-deficient patients. iNKT cell numbers in the peripheral blood of SAP-deficient and XIAP-deficient patients were significantly reduced when compared to those of healthy controls (**Fig. 1a**). As previously reported<sup>10,13</sup>, SAP-deficient patients were almost devoid of iNKT cells; this reduction was significantly less pronounced in XIAP-deficient patients (**Fig. 1a**). In five investigated XIAP-deficient patients, iNKT cell numbers were stable over time (**Fig. 1b**). All patients but one XIAP-deficient patient had previously been infected with EBV. Remarkably, the only XIAP-deficient patient with no evidence of EBV infection (i.e., negative viral load and absence of antibodies to EBV) exhibited the highest number of iNKT cells (**Fig. 1a**, arrow and P.1 in **Fig. 1b**). This patient who is a carrier of a null mutation of *XIAP* (E118X) is still asymptomatic at the age of 9 years.

### High susceptibility to apoptosis of *in vitro* expanded iNKT

Based on these observations and the known anti-apoptotic function of XIAP, we hypothesized that human iNKT cells could be particularly prone to apoptosis following activation and, thus being more dependent on XIAP for survival than conventional T cells. To test this hypothesis, apoptosis of iNKT cells in response to various stimuli was analyzed and compared with that of conventional T cells. V $\beta$ 2-expressing conventional T cells and iNKT cells from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of ten healthy individuals were expanded in parallel in response to their respective ligands TSST-1 and  $\alpha$ GalCer. Of note, healthy donors exhibited variable blood iNKT cell counts ranging from low to high (**Supplementary Table 1**). After one week of culture, expression of activation markers including CD45RO, CD45RA, CD25, CD69 and HLA-DR was analyzed on expanded iNKT and V $\beta$ 2 T cells (**Supplementary Fig. 1, left panels and Supplementary Fig. 2, right panels**). With the exception of HLA-DR which was more expressed by iNKT cells, there was no difference showing that both cell populations had an activated-memory phenotype. Activation-induced cell death (AICD) (also referred as restimulation-induced cell death) was examined in expanded V $\beta$ 2 T cells and iNKT cells in response to anti-CD3 antibody stimulation. AICD that depends on the FAS-FAS ligand interactions is an important mechanism that drives the deletion of activated T cells in self-limiting immune responses<sup>24,25</sup>. In all cases, AICD of iNKT cells was markedly increased compared to that of V $\beta$ 2 T cells (**Fig. 2a and Supplementary Fig. 3**). These results were not due to differences in CD3 expression between iNKT and conventional T cells since CD3 levels were similar (**Fig. 2b**). Apoptotic iNKT cells were observed as early as after six hours of stimulation

(**Supplementary Fig. 4**) and with all used concentrations of anti-CD3 antibody (**Fig. 2c**). Similar results were observed when iNKT cells were stimulated by B-cells expressing CD1d loaded with  $\alpha$ GalCer (**Fig. 2d**).

Susceptibility to apoptosis of iNKT cells was further investigated in response to stimuli inducing apoptosis either via the extrinsic pathway which depends on death receptors, including FAS, or the intrinsic pathway which targets the mitochondria<sup>25,26</sup>. FAS stimulation of expanded iNKT cells from nine different donors induced a substantial apoptosis that was not observed with V $\beta$ 2 T cells from the same donors (**Fig. 2e** and **Supplementary Fig. 3**). The intensity of apoptosis was not related to the expression level of FAS (CD95) which was similar for iNKT and V $\beta$ 2 T cells (**Fig. 2f**). This heightened rate of apoptosis with iNKT cells was observed with different concentrations of anti-FAS antibody and was blocked by z-VAD, a broad range inhibitor of caspases (**Fig. 2g**). The particular susceptibility of iNKT cells to apoptosis was also observed when cells were treated with etoposide (**Fig. 2h**), puromycin (**Fig. 2i**), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Fig. 2j**) and staurosporine (**Fig. 2k**), all reagents known to activate the intrinsic apoptosis pathway. Apoptosis was blocked by addition of z-VAD (**Fig. 2h** and data not shown). This susceptibility to apoptosis in response to FAS, CD3 and staurosporine was also observed with iNKT cells expanded from cord blood (**Fig. 3a**) and thymus (**Fig. 3b**). Of note, cord blood and thymus-derived cells were less of memory-activated effector phenotype than cells expanded from peripheral blood based on higher CD62L expression and lower expression of CD69 and HLA-DR that correlated with a weaker level of induced apoptosis (**Supplementary Fig. 1**). Collectively, these data demonstrate that iNKT cells but not conventional T cells exhibit an intrinsic pro-apoptotic feature that is already detected in the thymic and cord blood iNKT cells.

### High susceptibility to apoptosis of fresh iNKT cells

To be sure that the differences in apoptosis sensitivity between iNKT and conventional T cells did not result from *in vitro* culture conditions, we tested the apoptosis of fresh iNKT cells from PBMCs of four healthy donors without any prior *in vitro* expansion (**Fig. 3c**). Analysis of phenotypical markers including CD45RO, HLA-DR, CD25, CD69 and CD95 showed that most of fresh iNKT cells and V $\beta$ 2 T cells were not activated and had a memory phenotype (**Supplementary Fig. 2**). Furthermore, fresh iNKT cells were negative for Ki67 expression indicating that they were not cycling *in vivo* while a few V $\beta$ 2 T cells (1-2%) were Ki67+ (**Supplementary Fig. 5**). In contrast, expanded iNKT cells and V $\beta$ 2 T cells were cycling and displayed a memory-activated memory phenotype (**Supplementary Fig. 2**). Anti-CD3-induced apoptosis of fresh iNKT cells was more pronounced than of fresh V $\beta$ 2 T cells or total CD3+ T cells (**Fig. 3c**). As expected for cells that had not been pre-activated, the fraction of apoptotic cells was lower than that in *in vitro* cultured cell counterparts (see **Fig. 2**). Spontaneous apoptosis of fresh iNKT cells and V $\beta$ 2 T cells was also examined. After 72 hours, the fraction of apoptotic cells among iNKT cells was also higher than among V $\beta$ 2 T cells and total CD3+ cells (**Fig. 3d**). These results (i) support the assumption whereby iNKT cells are apoptosis-prone and (ii) demonstrate that the high apoptosis susceptibility is a general feature of these cells irrespective of their activation status. Interestingly, it was also observed that IL-15, known to drive iNKT cell survival and expansion, partially rescued iNKT cells from apoptosis induced in response to CD3, FAS and staurosporine stimulations (**Supplementary Fig. 6**). This suggests that *in vivo* factors such as IL-15 counteracts the pro-apoptotic feature of iNKT cells.

### XIAP regulates the pro-apoptotic phenotype of iNKT cells

We next determined the role of XIAP in apoptosis of iNKT cells by analyzing available iNKT cells from the XIAP-deficient patient (P.1) who had a normal NKT cell count



(see **Fig. 1**). Following anti-CD3 or anti-FAS stimulation of expanded iNKT cells, higher levels of apoptosis were observed compared to iNKT cells of a healthy donor (**Fig. 4a**). The intensity of apoptosis of XIAP-deficient iNKT cells was markedly higher than the one of XIAP-deficient V $\beta$ 2 T cells which did not differ from that of healthy donor V $\beta$ 2 T cells. The absence of XIAP protein expression thus results in a selective enhanced apoptosis in iNKT cells. In order to confirm these data, shRNA experiments were undertaken to down regulate XIAP expression in controls cells and see its effect on cell survival. A lentiviral vector containing shRNA construct with a GFP reporter gene was used to transduce both iNKT and V $\beta$ 2 T cells. Both GFP-positive targeted iNKT (GFP<sup>+</sup>) and V $\beta$ 2 T cells showed a strong decreased expression of XIAP (sh-XIAP cells) that was not seen in cells targeted with a scramble shRNA (sh-control cells) or in non-targeted GFP-negative cells (GFP<sup>-</sup>) (**Fig. 4b**). Apoptosis upon anti-FAS or anti-CD3 of GFP<sup>+</sup> and GFP<sup>-</sup> cells was then analyzed (**Fig. 4c,d**). In iNKT cells, GFP<sup>+</sup> sh-XIAP cells exhibited a higher apoptotic rate than GFP<sup>-</sup> and GFP<sup>+</sup> sh-control cells. Importantly, the apoptosis of GFP<sup>+</sup>V $\beta$ 2 T cells targeted with the XIAP shRNA was not clearly increased and similar to that of non-targeted GFP<sup>+</sup>V $\beta$ 2 T cells. Cells were also repeatedly stimulated with anti-CD3 or anti-FAS antibodies and the proportion of GFP<sup>+</sup> cells in culture analyzed at several time points (**Fig. 4e**). The fraction of GFP<sup>+</sup> cells expressing the scramble shRNA remained stable over the time. In contrast, the fraction of GFP<sup>+</sup>iNKT expressing the XIAP shRNA disappeared with a faster kinetic than iNKT cells expressing a control sh RNA or XIAP shRNA+V $\beta$ 2 T cells. Taken together, these data confirm that iNKT cells are much more dependent on XIAP for their survival than conventional T cells.

### **Elevated expression of pro-apoptotic proteins in iNKT cells**

The molecular mechanism underlying susceptibility to apoptosis of iNKT cells was thus analyzed. Protein expression of several effectors of apoptosis such as members of the Bcl-2 family and executioner caspases was determined in expanded iNKT and V $\beta$ 2 T cells from three healthy individuals by western blotting. BID, pro-caspases 3, 7 and cleaved forms of caspase 3 were found to be more strongly expressed in expanded iNKT cells compared to V $\beta$ 2 T cells (**Fig. 5a**). Expression of XIAP was also increased in expanded iNKT cells. Consistent with this pro-apoptotic molecular signature, the proportion of *ex vivo* iNKT cells expressing activated caspases, as detected by a fluorescent inhibitor of activated caspases (FLICA), was found to be higher compared to that of V $\beta$ 2 T cells or of total CD3<sup>+</sup> T cells (**Fig. 5b**). Therefore, these results suggest that the up-regulation of pro-apoptotic molecules such as caspases 3, 7 and BID in iNKT cells accounts for their exquisite susceptibility to apoptosis triggers.

### **The transcription factor PLZF regulates the pro-apoptotic phenotype of iNKT**

iNKT cells are characterized by the expression of the transcription factor PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger, ZBTB16) which is involved in the acquisition of the effector phenotype of iNKT cells<sup>27,28</sup>. PLZF was also shown to inhibit cell growth in relation with increased expression of pro-apoptotic genes and apoptosis in tumor cells<sup>29-31</sup>. For these reasons, we tested whether PLZF could be involved in the pro-apoptotic phenotype of iNKT (**Fig. 6**). Down regulation of PLZF expression using two distinct shRNA in expanded iNKT resulted in a decreased apoptosis induced by staurosporine or FAS (**Fig. 6a,b,c**). Repeated FAS stimulations resulted in the accumulation of targeted GFP<sup>+</sup> iNKT cells in culture (**Fig. 6c**). This was not observed with iNKT cells expressing a control shRNA. Conversely, over expression of PLZF using a lentiviral plasmid containing a PLZF transgene in V $\beta$ 2 conventional T cells and in CD3<sup>+</sup> T cell blasts increased their susceptibility to apoptosis and their loss upon repeated FAS stimulations (**Fig. 6d,e,f and Supplementary Fig. 7**). Similarly,

over expression of PLZF in Jurkat T cells increased their susceptibility to apoptosis triggered by FAS and staurosporine (**Fig. 6g,h,i**). In iNKT cells, one of the candidate targets of PLZF may be the caspase 3 which was found to be over expressed (**Fig. 5a**). The PLZF effect on a luciferase reporter gene under the control of the *CASPASE 3* promoter was tested in Jurkat TAg cells. PLZF was indeed found to increase luciferase activity (**Fig. 6j**) also leading to caspase 3 and cleaved products over expression (**Fig. 6k**). Therefore, these data showed that the pro-apoptotic phenotype of iNKT cells is in part dependent of PLZF through caspase 3 induction.

### **MAIT cells exhibit a pro-apoptotic feature like iNKT cells**

MAIT cells represent a second invariant T cell population which accumulate in the intestinal lamina propria and blood in humans at a relatively high frequency (accounting for 1 to 8% of total T cells)<sup>7</sup>. MAIT cells share with iNKT cells numerous features distinguishing them from conventional T cells including high expression of PLZF<sup>6</sup>. We therefore sought to determine whether MAIT cells behave like iNKT cells in terms of apoptosis sensitivity (**Fig. 7**). MAIT cells corresponding to CD161<sup>high</sup>V $\alpha$ 7.2+CD3+ were found to be 10-fold less prevalent in the blood of XIAP-deficient patients compared to healthy donors (>1%), while they are slightly diminished in the blood of SAP-deficient patients (**Fig. 7a,b**). Next, apoptosis of fresh MAIT cells from PBMCs from four healthy donors was analyzed in response to anti-CD3 stimulation. MAIT cells exhibited a stronger apoptosis when compared to that of V $\beta$ 2 T cells (**Fig. 7c**). High rate apoptosis of MAIT cells in response to CD3, FAS or staurosporine stimulation was also observed in cell cultures of iNKT cell expansions, in which slowly growing MAIT cells are present (**Fig. 7d**). The level of induced apoptosis in MAIT cells in the different conditions tested was similar to that observed in iNKT cells. Similarly to iNKT cells, the proportion of fresh MAIT cells expressing activated caspases (>10%) was elevated compared to V $\beta$ 2 T cells (<2.5%) (**Fig. 5b** and **7e**). Remarkably, fresh MAIT from two XIAP-deficient patients exhibited like iNKT cells an increased apoptosis following stimulation by staurosporine relative to cells of a healthy donor (**Fig. 7f**). Finally, down regulation of PLZF by using a shRNA in MAIT cells significantly decreased their apoptosis in response to staurosporine (**Fig. 7g**). Taken together, these observations indicate that like iNKT cells, MAIT cells are particularly sensitive to apoptotic stimuli, their survival being reciprocally dependent on XIAP and PLZF.

## **DISCUSSION**

This study identified the anti-apoptotic molecule XIAP and the transcription factor PLZF as key components of the homeostasis of invariant T cells in humans. We provided evidence that iNKT cells and MAIT cells are highly susceptible to apoptosis, a feature not shared with conventional T cells. Susceptibility to apoptosis affected both intrinsic and extrinsic pathways. In agreement with these observations, expression of caspases 7 and 3 and their activated forms was found to be up regulated in iNKT and MAIT cells prior to any stimulation. As caspases 3 and 7 are distal executioner caspases<sup>32</sup> activated by many apoptosis pathways, their enhanced expression and activation likely accounts for the pro-apoptotic nature of invariant T cells.

The pro-apoptotic phenotype of iNKT cells and MAIT cells was found to be controlled by the transcription factor PLZF which is selectively highly expressed in these cells (in comparison to other T cell subpopulations)<sup>5</sup>. PLZF is a key transcription factor required for the effector differentiation of iNKT cells in mice<sup>27,28</sup>. In PLZF-deficient mice, the development of iNKT cells is partially impaired and iNKT cells failed to acquire innate-like features including memory phenotype and rapid secretion of large amounts of IL-4 and IFN- $\gamma$ .



The pro-apoptotic phenotype reported here represents a unique feature of innate-like T lymphocytes. Thus PLZF coordinates several features of innate-like T cells that include a pro-apoptotic caspase 3 dependent phenotype. Interestingly, expression of PLZF in other cell types including tumor cells has been reported to be associated with an increase of apoptosis<sup>29-31</sup>. In our experiments, the inhibition of PLZF expression only partially reduced the pro-apoptotic phenotype of iNKT cells likely because the down regulation of PLZF was not complete. Also, decreasing PLZF expression in mature iNKT cells from the periphery as we did might not completely compromised their pro-apoptotic phenotype as PLZF is involved in the development steps of iNKT cells in the thymus. In tumor cells, PLZF expression induced growth suppression and apoptosis indicating that pro-apoptotic genes are targets of PLZF<sup>29-31</sup>. Ectopic expression of PLZF in malignant mesothelioma cells resulted in increased apoptosis in association with increased expression of cleaved caspase 3<sup>31</sup>, similarly to what we observed in PLZF ectopically-expressing Jurkat cells. In addition, one cannot exclude that this pro-apoptotic phenotype is also controlled by other transcription factors in combination with PLZF.

The exquisite XIAP dependency of iNKT cells for survival is thus likely explained by the fact that activity of caspases-3 and -7 is specifically blocked by XIAP<sup>20,21</sup>. In proliferating T cells, it has been shown that interaction with XIAP prevents full caspase-3 and -7 activation<sup>33</sup>. However, removing XIAP from conventional T cells had a lesser impact on their survival in comparison with iNKT cells, consistent with the fact that conventional T cells expressed lower amounts of these caspases. We indeed noticed that the expression of XIAP is higher in expanded iNKT cells than in V $\beta$ 2 T cells. This could suggest a concordant regulation of caspases and XIAP expression with increased XIAP expression counteracting up to a certain magnitude consequences of PLZF-induced high caspase expression in iNKT cells, thus allowing enhanced survival albeit to a limited extent. However, one cannot rule out the possibility that the anti-apoptotic function of XIAP in iNKT cells is also related to its ability to activate NF $\kappa$ B. Counteracting the pro-apoptotic characteristics of iNKT cells could be also achieved by modulating regulators of apoptosis other than XIAP such as IL-15, which is required for iNKT expansion in mice<sup>34,35</sup>. The prosurvival effect of IL-15 has consistently been previously ascribed to its capacity to increase expression of the anti-apoptotic factors, Bcl-2 and Bcl-xL in NK cells and T cells<sup>36,37</sup>.

We also found that the pro-apoptotic phenotype of iNKT cells is shared by MAIT cells, the second invariant T cell lineage in humans<sup>5,7</sup>. Both invariant T cell populations exhibit a memory/activated phenotype and behave as innate-like lymphocytes via their ability to produce large amount of cytokines. iNKT cells are considered to be autoreactive by the endogeneous nature of the glycosphingolipids they recognize while numerous studies in mice have documented that iNKT cells are rapidly activated during the initial phase of an immune response<sup>1</sup>. Based on these unique features, the pro-apoptotic nature of iNKT and MAIT cells may serve to rapidly and tightly control their magnitude of activation and expansion in order to avoid deleterious effects, thus accounting for the limited pool size *in vivo*.

Our study has focused on human cells because lymphocytes from mice deficient for XIAP do not exhibit an obvious pro-apoptotic phenotype<sup>38,39</sup> and hence do not represent a relevant model for XLP-2 disease<sup>40</sup>. It has been suggested that there might be a compensation in mice via XIAP-related inhibitors of apoptosis proteins, such as IAP-1 and IAP-2 or the recently identified XIAP-like “pseudogene” located on chromosome 7 which may give rise to truncated polypeptides able to function as inhibitors of apoptosis<sup>39,41</sup>. Apoptotic pathways in humans and mice might also be regulated in different ways. Indeed, we failed to observe a depletion of iNKT cells in XIAP-deficient mice, while murine iNKT cells exhibit an increased susceptibility to apoptosis like human iNKT cells (S. Gérard and S. Latour,

unpublished data). In addition, it has been shown that a strong activation of iNKT cells results in anergy rather than apoptosis in mice<sup>42</sup>.

Our demonstration of a pro-apoptotic feature of iNKT cells provides a reliable explanation for the iNKT cell defects reported in a number of pathological contexts in humans including autoimmunity, allergic/inflammatory diseases, cancers and infectious diseases that may trigger rapid exhaustion of these cells<sup>1,8</sup>. In the cohort of patients we studied here, depletion of iNKT cells in XIAP-deficiency is correlated with EBV infection suggesting that it could be secondary to EBV infection. EBV-infected cells could induce increased apoptosis of iNKT cells directly through the recognition of agonist self glycosphingolipids presented by EBV infected cells as iNKT cells are strongly induced to undergo apoptosis by CD1d-expressing B cells (shown in **Fig.2d**), an event that is exacerbated in the absence of XIAP.

Our study showed that PLZF is a master player of the innate-like T cell differentiation that coordinates their effector functions by limiting the cell survival as a safeguard to the rapid activation of innate-like T cells. The identification of a unique PLZF-dependent pro-apoptotic feature counterbalanced by XIAP which is restricted to innate-like T cells provides an important insight into the biology of these cells.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the patients, their families and the healthy donors for cooperation. We thank Dr. Hamidou, Dr. Kanegane and Dr. Pellier for their interest and clinical care of patients. We also thank the NIH Tetramer Core Facility for providing reagents. This work was supported by grants from INSERM, ANR (ANR-08-MIEN-012-01) (France) and the XLP Research Trust (United Kingdom), and grant from the European Research Council (ERC-2009-AdG\_20090506 n°FP7-249816). S. L. is a senior scientist of CNRS (France). S.G. is a fellowship recipient of the Ministère de la Recherche et de l'Ecole Polytechnique (France) and the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (ARC) (France). C.A. is supported by the ARC and E. M. by the ANR (France) and the Ligue contre le cancer (France).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

S.G. and S.S performed most of the experiments, analyzed the data and participated in writing of the report. C.A., C.L. and E.M. performed experiments. A.F., C.P. and O.L analyzed the data and participated in writing of the report. S.L. directed the study, designed research, analyzed the data, wrote the report and edited the manuscript.

## COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1. Decreased numbers of iNKT cells in PBMCs from XIAP-deficient patients.** (a) Comparison of iNKT cell (TCRV $\alpha$ 24+TCRV $\beta$ 11+) counts within CD3+ lymphocytes from blood of control healthy donors (Ctrl.), SAP-deficient patients (SAP) and XIAP-deficient patients (XIAP). iNKT cells were detected by staining with anti-V $\alpha$ 24 and anti-V $\beta$ 11 TCR antibodies and analyzed after gating on CD3+ cells. The arrow points to patient #1 (P.1) with normal iNKT cell counts. Bars correspond to mean values of each group of iNKT cell numbers, unpaired *t* test, \**P*<0.05, \*\*\**P*<0.001. (b) Six XIAP-deficient patients (P.1, P.2, P.3, P.4, P.5 and P.6) have been tested two or three times at six- to twelve-month intervals. All XIAP-patients have been infected by EBV (EBV+) except P.1.

**Figure 2. Both intrinsic and extrinsic triggers of apoptosis induce a marked apoptosis of iNKT cells in contrast to conventional V $\beta$ 2 T cells.** (a) Activation induced-cell death of expanded iNKT and V $\beta$ 2 T cells from ten different healthy donors (#1 to #8, #14 and #17, see also Supplementary Table 1) stimulated with anti-CD3 antibody (OKT3). Error bars correspond to assays done in duplicate. (b) Expression of CD3 on iNKT and V $\beta$ 2 cells by flow cytometry. Grey histograms represent the isotype control and the black lines represent the anti-CD3. Data correspond to one representative experiment of ten. (c) Same as a, except that cells were stimulated with increasing concentrations of anti-CD3 antibody. Data of one experiment with one healthy donor (#6) with assays done in duplicate (error bars). (d) iNKT cells have been incubated with RAJI cells expressing CD1d with medium (med.) or  $\alpha$ GalCer. Apoptotic iNKT cells were analyzed 24 hours later. Data correspond to one representative experiment of three with two different donors (#9, #6) (e) Apoptosis of expanded iNKT and V $\beta$ 2 T cells from nine different healthy donors stimulated with soluble anti-FAS antibody (APO1.3). Assays were done in duplicate (error bars). (f) Expression of FAS (CD95) on iNKT and V $\beta$ 2 T cells by flow cytometry. Grey histograms represent the isotype control and the black lines represent the anti-CD95 antibody staining. Data correspond to one representative experiment of seven. (g) Same as e, except that cells from four different healthy donors were stimulated with increasing concentrations of APO1.3 in the presence or not of z-VAD. One representative experiment of four independent experiments with four healthy donors (#3, #4, #6, #20) is showed with assays done in duplicate. (h) Expanded cells from one healthy donor (#4) were incubated with increasing concentrations of etoposide. With the highest concentration of etoposide, cells were also incubated with z-VAD (right panel). (i) Stimulation with increasing concentrations of puromycin. Data are means $\pm$ s.d. of three experiments with three healthy donors (#5, #6 and #9) with assays done in duplicate. (j) Stimulation with increasing concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Data are means $\pm$ s.d. of two experiments with two healthy donors (#6 and #9) with assays done in duplicate. (k) Stimulation with increasing concentrations of staurosporine. Data are means $\pm$ s.d. of two experiments in duplicate with two healthy donors (#7 and #9).

**Figure 3. iNKT cells expanded from cord blood or thymus and freshly isolated iNKT cells are more prone to apoptosis than V $\beta$ 2 conventional T cells.** (a) Expanded iNKT and V $\beta$ 2 T cells from blood and cord-blood were stimulated with anti-CD3 antibody, anti-FAS antibody or staurosporine. Data correspond to two experiments done in duplicate (error bars) with cells from two different donors (#7 and #14) and two different cord blood donors. (b) Expanded iNKT and V $\beta$ 2 T cells from one blood donor and thymocytes of one donor were stimulated with anti-CD3 or anti-FAS antibodies. Data correspond to one

experiment with assays done in duplicate (error bars). (c) Apoptosis of freshly isolated PBMCs from four different healthy donors (#4, #6, #9 and #12) stimulated with anti-CD3 antibody for eight hours. (d) Apoptosis of freshly isolated iNKT cells and V $\beta$ 2 T cells of PBMCs from two healthy donors (#9 and #13) left unstimulated for seventy-two hours.

**Figure 4. XIAP-deficiency worsens the pro-apoptotic phenotype of iNKT cells.** (a) Apoptosis of expanded iNKT and V $\beta$ 2 T cells from one XIAP-deficient patient (P.1 in Figure 1) and one healthy donor (#16) stimulated with anti-CD3 or anti-FAS antibodies. Data are representative of one experiment of two. Assays were done in duplicate (error bars). (b) iNKT and V $\beta$ 2 T cells from healthy donors were infected with a lentiviral pLKO-GFP vector containing either a shRNA for XIAP (sh-XIAP) or scramble shRNA (sh-control). At day four after infection, iNKT and V $\beta$ 2 T cells were tested for GFP (left panels) and XIAP (right panels) expression by flow cytometry. Histograms correspond to staining with anti-XIAP antibody or isotype control in GFP-positive (GFP<sup>+</sup>) and GFP-negative (GFP<sup>-</sup>) cells. (c) Apoptosis of GFP<sup>+</sup> and GFP<sup>-</sup> iNKT and V $\beta$ 2 T cells stimulated with anti-CD3 antibody. Data are means $\pm$ s.d. of three independent experiments with three different healthy donors (#6, #9 and #13) with assays done in duplicate. Paired, two-tailed *t*-test, *\*\*P* < 0.01. (d) Apoptosis of GFP<sup>+</sup> iNKT and V $\beta$ 2 cells stimulated with anti-FAS antibody. Data correspond to one experiment representative of two with assays done in duplicate (error bars). (e) Same as in c and d, except that cells were repeatedly treated with anti-CD3 or anti-FAS antibodies every day and the proportions of GFP<sup>+</sup> iNKT and GFP<sup>+</sup> V $\beta$ 2 cells in cultures was determined by flow cytometry. Data represent the loss of GFP<sup>+</sup> cells targeted with the shRNA for XIAP or the sh-control within the culture when compared to the percentage of GFP<sup>+</sup> cells at day 0. One representative experiment of two.

**Figure 5. iNKT cells express high amounts of caspases in contrast to conventional V $\beta$ 2 T cells.** (a) Cell lysates of expanded iNKT and V $\beta$ 2 T cells from blood of three healthy donors (#4, #6 and #9) were analyzed by SDS-PAGE and subsequent western-blotting for several pro- and anti-apoptotic proteins, as indicated. \*corresponds to proteins over expressed in iNKT cells, relative to V $\beta$ 2 T cells. (b) Active caspases were detected by flow cytometry in fresh isolated iNKT cells, V $\beta$ 2 T cells and CD3<sup>+</sup> T cells from PBMCs of three healthy donors (#4, #6 and #9). After gating on CD3<sup>+</sup>TCR-iNKT<sup>+</sup> (iNKT), CD3<sup>+</sup>TCRV $\beta$ 2<sup>+</sup> (V $\beta$ 2) or CD3<sup>+</sup> T cells (CD3<sup>+</sup>), cells were stained by a fluorescent inhibitor of activated caspases (FLICA) allowing detection of activated caspases.

**Figure 6. The transcription factor PLZF controls the pro-apoptotic phenotype of iNKT cells.** (a) Expression of PLZF in expanded GFP<sup>+</sup> iNKT targeted by a control shRNA (sh-control) or specific for PLZF (sh-PLZF) by flow cytometry. Grey histograms, isotype control; black lines, anti-PLZF. One representative experiment out of four (b) Staurosporine induced apoptosis of GFP<sup>+</sup> iNKT cells targeted with a control shRNA (sh-control) or two shRNA specific for PLZF (sh-PLZF-1-, *n*=6; sh-PLZF-2-, *n*=3) (c) same as b excepted that GFP<sup>+</sup> iNKT cells were analyzed for FAS-induced apoptosis (left panel, *n*=5). In the right panel, cells were repeatedly treated with anti-FAS antibodies every 24 hours and the proportions of GFP<sup>+</sup> cells in the cultures were determined. Data represent the ratio of the percentage of GFP<sup>+</sup> cells in the culture to the percentage of GFP<sup>+</sup> cells at time 0. One representative experiment of two with two donors (#4 and #9). (d) Expression of PLZF in expanded V $\beta$ 2 T cells infected by a lentiviral empty vector (empty vector) or containing a

PLZF transgene (Tg-PLZF). Grey histograms, isotype control; black lines, anti-PLZF. One representative experiment out of 4 **(e)** Staurosporine induced apoptosis in GFP<sup>+</sup> V $\beta$ 2 T cells expressing the empty vector (empty vector) or a PLZF transgene (Tg-PLZF) ( $n=3$ , donors #4, #6 and #9) **(f)** same as **(c)**. FAS-induced apoptosis in GFP<sup>+</sup> V $\beta$ 2 T cells expressing the empty vector (empty vector) or a PLZF transgene (Tg-PLZF) ( $n=4$ , donors #4, #6 and #9) **(g)** Expression of PLZF in Jurkat cells infected by a lentiviral empty vector (empty vector) or containing a PLZF transgene (Tg-PLZF). Grey histograms, isotype control; black lines, anti-PLZF. **(h)** FAS-induced apoptosis in Jurkat cells expressing PLZF (Tg-PLZF) or not (empty vector) ( $n=4$ ). **(i)** Staurosporine-induced apoptosis in Jurkat TAg cells infected by a lentiviral empty vector (empty vector) or containing a PLZF transgene (Tg-PLZF) PLZF (Tg-PLZF) ( $n=3$ ). **(j)** Activity of the promoter P1 of caspase 3 measured by a reporter luciferase assay in Jurkat TAg cells expressing PLZF (Tg-PLZF) or the empty vector. Data of two independent experiments with quintuplicates, mean  $\pm$ s.d. **(k)** Blots of the expression of actin, PLZF, caspase 3 (CASP3), cleaved caspase 3 (CASP3 cleaved) and Ku70 in wild type Jurkat TAg cells (WT) or expressing PLZF (Tg-PLZF) or the empty vector. On the right, quantification of caspase 3 and cleaved caspase 3 expressions in Jurkat TAg cells expressing PLZF compared to the empty vector and normalized on actin expression. Paired, two-tailed  $t$ -test in **b**, **c**, **e**, **f**, **h** and **i** with data mean  $\pm$ s.d. and  $n$ =number of independent experiments with duplicate. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ .

**Figure 7. MAIT cells like iNKT cells are more prone to apoptosis than conventional T cells.** **(a)** Flow cytometry analysis of MAIT cells (CD3<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>). MAIT cells from PBMCs of two healthy donors (Ctr.) and two XIAP- patients (XIAP) were detected by staining with anti-TCRV $\alpha$ 7.2 and anti-CD161 antibodies and analyzed after gating on CD3<sup>+</sup> cells. **(b)** Comparison of numbers of MAIT cells (TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>) in CD3<sup>+</sup> lymphocytes from PBMCs of control healthy donors (Ctr.) ( $n=15$ ), SAP-deficient patients (SAP) ( $n=5$ ) and XIAP-deficient patients (XIAP) ( $n=16$ ). Bars correspond to mean values of each group of cell numbers, unpaired  $t$  test, \*\*\* $P<0.001$ . **(c)** Apoptosis of *ex-vivo* MAIT and V $\beta$ 2 T cells from PBMCs of four healthy donors (#4, #6, #9 and #12) following stimulation with anti-CD3 antibody or staurosporine for eight hours. **(d)** Apoptosis of cultured MAIT cells stimulated with anti-CD3 or anti-FAS antibodies. Data correspond to one experiment in duplicate (error bars) with two donors (#4 and #7). **(e)** Active caspases were detected by flow cytometry using FLICA in *ex-vivo* MAIT cells from two healthy donors (#4 and #6) after gating on CD3<sup>+</sup>TCRV $\alpha$ 7.2<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>. **(f)** Apoptosis of *ex-vivo* MAIT and iNKT cells from PBMCs of two XIAP-deficient patients (P.1 and P.2 in Figure1) and from one healthy donor (#9) stimulated with staurosporine for eight hours. Data correspond to one experiment. **(g)** Staurosporine induced apoptosis of *ex vivo* MAIT cells targeted by a control shRNA (sh-control) or a shRNA specific for PLZF (sh-PLZF-1-). Four independent experiments ( $n=4$ ) with two different donors (#21 and 22). \* $P<0.05$ . Paired, two-tailed  $t$ -test.



## METHODS

### Cell cultures

Peripheral blood samples were collected from patients carriers of XIAP mutations<sup>14</sup> and healthy donors or from buffy coats obtained from EFS (Etablissement Français du Sang). Informed consent was obtained from each donor and patients and the study protocols are conformed to the 1975 declaration of Helsinki and the local ethics regulations. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll-Paque density gradient from blood samples using standard procedures. Cord blood samples were harvested on delivery of full-term, healthy pregnancies, after obtaining the mother's written informed consent according to the current French legislation and ethical guidelines. Post-natal thymus was obtained from a child undergoing corrective cardiac surgery (Service de Chirurgie Cardiaque Pédiatrique, hôpital Necker, Paris, France). The thymus was mechanically disrupted and filtered through a cell strainer (70 µm; Becton Dickinson).

For expansions of iNKT cells and Vβ2T cells, PBMCs (500 000/ml) of donors were cultured in complete medium containing RPMI 1640 GlutaMax (Invitrogen) supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml), IL-2 (1000UI/ml) and 10 % heat-inactivated fetal calf serum (GIBCO) in the presence of 100 ng/ml alpha-Galactosylceramide (αGalCer) (Alexis) or 0.5 µg/ml toxic shock syndrome toxin (TSST-1) (Toxin Technology Inc.), respectively. After eight days of culture, the proportions of iNKT cells and Vβ2 T cells in the cultures varied from 1.5% to 50% and from 10% to 70% respectively. For expansions from thymus, 2.5x10<sup>6</sup>/ml of thymocytes were cultured.

### Flow cytometry

The following mAbs conjugated to FITC, PE, APC, PerCP, PerCP-Cy5.5, Pacific blue, APC-Cy7 or biotin from BD Biosciences were used: anti-CD3 (SK7), anti-human invariant NKT cells mAb (6B11, BD) (referred to as anti-TCR-iNKT), anti-CD25 (M-A251), anti-CD45RO (UCHL1), anti-CD45RA (HI100), anti-CD69 (L78), anti-HLA-DR (L243), anti-CD95 (DX2), CCR7 (3D12), CD62L (Dreg 56) and anti-CD161 (PK136). PE-Cy7-conjugated anti-CD3 (UCHT-1) was from eBioscience. PE-conjugated anti-TCRVβ2 (MPB2D5), FITC-conjugated anti-TCRVβ11 (C21), PE-conjugated anti-Vα24TCR (C15) were from Beckman Coulter. APC-conjugated PBS-57-loaded CD1d tetramers (referred to as CD1d-TT) were provided by the NIH Tetramer Core Facility. FITC-conjugated anti-Vα7.2TCR antibody (3C10) was previously described<sup>7</sup>.

Cells were labeled according to standard protocols. iNKT in PBMCs were detected by staining with anti-Vβ11TCR, anti-Vα24TCR and anti-CD3. In apoptosis and phenotyping experiments, iNKT cells were labeled with anti-CD3, anti-TCR-iNKT or with PBS-57-loaded CD1d tetramers. Vβ2 T cells were detected with anti-TCRVβ2 and anti-CD3. MAIT cells were detected with anti-CD161, anti-TCRVα7.2 and anti-CD3. In apoptosis assays, apoptotic cells were labeled by annexin V (APC-, V500- or PE-conjugated) alone or in combination with 7-AAD Viaprobe (BD Biosciences) according to standard protocols.

Active caspases were detected using FLICA reagent (Sigma), following the manufacturer's protocol. For intracellular staining of XIAP, cells were permeabilized using Intraprep kit (Beckman Coulter) and stained with the mouse anti-human XIAP from BD (clone 48) revealed by a pacific-blue conjugated goat anti-mouse antibody (BD). Intracellular staining of PLZF and Ki67 were performed with the mouse APC-conjugated anti-PLZF (clone 6318100) (R&D system) and the mouse APC-conjugated anti-Ki-67 (clone B56) (BD). Samples were acquired on a FACScanto II flowcytometer (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo software (TreeStar).

### **Apoptosis assays**

For activation-induced cell death (AICD), cells were stimulated with 10 µg/ml of coated anti-CD3 (OKT3, Janssen-Cilag). In FAS-induced apoptosis assays, cells were stimulated in the presence of 100 ng/ml of soluble APO1.3 (Alexis) and 5 µg/ml of rabbit anti-mouse IgG Fab'2 (Jackson ImmunoResearch). Staurosporine was used at 0.25 µM. Etoposide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and staurosporine were from Sigma. In the different assays, *in vitro* expanded cells and *ex-vivo* cells were stimulated 24 h and 8 h respectively. The pan caspase fmk inhibitor z-VAD was used at a concentration of 200 µM (R&D systems). Apoptotic cells were detected by staining with annexin V and 7-AAD after gating on CD3+TCR-iNKT+ (anti-human invariant NKT cell antibody) or CD3+CD1d-TT+ (PBS-57-loaded CD1d tetramers), CD3+TCRVβ2+ and CD3+CD161+TCRVα7.2+, respectively. The evaluation of apoptosis was based on the percentage of annexin V+ cells or annexin V+/7-AAD- to exclude necrotic cells. The percentage of induced apoptosis was calculated according to the formula: 100 X (% of experimental apoptotic cells-% of spontaneously apoptotic cells)/(100-% of spontaneously apoptotic cells).

### **Statistical analysis**

The statistical analysis of results was performed using Prism software.

### **Transduction of cells with sh-RNA**

Cell expansions were transduced at day 3 with the lentiviral vector pLKO.1 containing a sh-RNA for XIAP (Openbiosystems, n°TRCN0000003788), for PLZF (Openbiosystems, clone 1 n° TRCN0000012940, clone 2 n°TRCN0000012942) or a scramble sh-RNA, in which the puromycine resistant gene was replaced by the reporter GFP gene. Apoptosis was induced as described above and apoptosis was determined in GFP-positive and GFP-negative cells. For survey of GFP expression in long term expansion, cells were repeatedly stimulated with 1 µg/ml OKT3 or 25 ng/ml APO1.3.

### **Immunoblots**

Expanded iNKT cells and Vβ2 T cells were sorted using a combination of anti-CD3-APC and anti-TCR-iNKT-PE or anti-TCRVβ2-PE antibodies on a BD FACSARIA II cell sorter. Cell lysates and immunoblots were performed according to standard protocols. Anti-human XIAP (clone 28), SMAC (clone 7), FADD (clone 1) monoclonal antibodies were from BD Biosciences. Anti-Ku-80 (KuAb-2) and Ku-70 monoclonal antibodies were from NeoMarkers. Antibodies to Bax (2772), Bcl-2 (50E3), Caspase-3 (9662), Caspase-7 (9492), Caspase-9 (9508), Bim (2819), Bid (2002), PUMA (4976) and Bcl-xL (54H6) antibodies were from Cell Signaling Technology. Anti-APAF-1 (94408) monoclonal antibody was from R&D Systems. Anti-PLZF (D9) monoclonal antibody was from Santa Cruz Biotechnology. Quantifications of western blots were done using ImageJ 1.45 software (NIH).

### **Luciferase assay for the caspase 3 promoter**

Jurkat TAg cells were transduced with an empty lentiviral vector (lenti 7.3) or with a PLZF expressing vector with the GFP as a reporter. Cells were sorted on an ARIA II flow cytometer according to the GFP expression and CD3 expression. Cells were then transfected using lipofectamine by a the pGL3-Basic luciferase vector (Promega) containing the full-length promoter (P1) of human caspase 3<sup>43</sup> (a kind gift of Dr. Bong Lee, NIH, Bethesda, MA). Luciferase activity was measured using the luciferase assay system (Promega) on a Mithras Microplate Reader (Berthold Technologies).



## SUPPLEMENTAL INFORMATION

The supplemental material includes 7 figures and one table.

## REFERENCES

1. Bendelac, A., Savage, P.B. & Teyton, L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* **25**, 297-336 (2007).
2. Gapin, L. iNKT cell autoreactivity: what is 'self' and how is it recognized? *Nat Rev Immunol* **10**, 272-7 (2010).
3. Das, R., Sant'Angelo, D.B. & Nichols, K.E. Transcriptional control of invariant NKT cell development. *Immunol Rev* **238**, 195-215 (2010).
4. Treiner, E. et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* **422**, 164-9 (2003).
5. Dusseaux, M. et al. Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* **117**, 1250-9 (2011).
6. Le Bourhis, L. et al. Mucosal-associated invariant T cells: unconventional development and function. *Trends Immunol* **32**, 212-8 (2011).
7. Martin, E. et al. Stepwise development of MAIT cells in mouse and human. *PLoS Biol* **7**, e54 (2009).
8. Berzins, S.P., Smyth, M.J. & Baxter, A.G. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol* **11**, 131-42 (2011).
9. Rigaud, S. et al. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* **444**, 110-4 (2006).
10. Pasquier, B. et al. Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med* **201**, 695-701 (2005).
11. Huck, K. et al. Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation. *J Clin Invest* **119**, 1350-8 (2009).
12. Locci, M. et al. The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for iNKT cell maturation and function. *J Exp Med* **206**, 735-42 (2009).
13. Nichols, K.E. et al. Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nat Med* **11**, 340-5 (2005).
14. Pachlopnik Schmid, J. et al. Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP deficiency). *Blood* **117**, 1522-9 (2011).
15. Rezaei, N., Mahmoudi, E., Aghamohammadi, A., Das, R. & Nichols, K.E. X-linked lymphoproliferative syndrome: a genetic condition typified by the triad of infection, immunodeficiency and lymphoma. *Br J Haematol* **152**, 13-30 (2010).
16. Coffey, A.J. et al. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet* **20**, 129-35. (1998).
17. Sayos, J. et al. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* **395**, 462-9. (1998).
18. Nichols, K.E. et al. Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13765-70. (1998).
19. Griewank, K. et al. Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity* **27**, 751-62 (2007).
20. Deveraux, Q.L., R., T., Salvesen, G.S. & Reed, J.C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300-4 (1997).

21. Eckelman, B.P., Salvesen, G.S. & Scott, F.L. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* **7**, 988-94 (2006).
22. Damgaard, R.B. et al. The Ubiquitin Ligase XIAP Recruits LUBAC for NOD2 Signaling in Inflammation and Innate Immunity. *Mol Cell* **46**, 1-13 (2012).
23. Galban, S. & Duckett, C.S. XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death Differ* **17**, 54-60 (2009).
24. Hildeman, D., Jorgensen, T., Kappler, J. & Marrack, P. Apoptosis and the homeostatic control of immune responses. *Curr Opin Immunol* **19**, 516-21 (2007).
25. Bouillet, P. & O'Reilly, L.A. CD95, BIM and T cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* **9**, 514-9 (2009).
26. Brenner, D. & Mak, T.W. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 871-7 (2009).
27. Kovalovsky, D. et al. The BTB-zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nat Immunol* **9**, 1055-64 (2008).
28. Savage, A.K. et al. The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage. *Immunity* **29**, 391-403 (2008).
29. Yeyati, P.L. et al. Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene* **18**, 925-34 (1999).
30. Shaknovich, R. et al. The promyelocytic leukemia zinc finger protein affects myeloid cell growth, differentiation, and apoptosis. *Mol Cell Biol* **18**, 5533-45 (1998).
31. Cheung, M. et al. The promyelocytic leukemia zinc-finger gene, PLZF, is frequently downregulated in malignant mesothelioma cells and contributes to cell survival. *Oncogene* **29**, 1633-40 (2010).
32. Shi, Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* **9**, 459-70 (2002).
33. Paulsen, M. et al. Interaction with XIAP prevents full caspase-3/-7 activation in proliferating human T lymphocytes. *Eur J Immunol* **38**, 1979-87 (2008).
34. Ranson, T. et al. IL-15 availability conditions homeostasis of peripheral natural killer T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2663-8 (2003).
35. Matsuda, J.L. et al. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nat Immunol* **3**, 966-74 (2002).
36. Malamut, G. et al. IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. *J Clin Invest* **120**, 2131-43.
37. Carson, W.E. et al. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest* **99**, 937-43 (1997).
38. Jost, P.J. et al. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature* **460**, 1035-9 (2009).
39. Harlin, H., Reffey, S.B., Duckett, C.S., Lindsten, T. & Thompson, C.B. Characterization of XIAP-deficient mice. *Mol Cell Biol* **21**, 3604-8 (2001).
40. Rumble, J.M. et al. Phenotypic differences between mice deficient in XIAP and SAP, two factors targeted in X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP). *Cell Immunol* **259**, 82-9 (2009).
41. Kotevski, A., Cook, W.D., Vaux, D.L. & Callus, B.A. Identification of an Xiap-like pseudogene on mouse chromosome 7. *PLoS One* **4**, e8078 (2009).
42. Parekh, V.V. et al. Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. *J Clin Invest* **115**, 2572-83 (2005).
43. Sohn, E.J. et al. EWS/FLI1 oncogene activates caspase 3 transcription and triggers apoptosis in vivo. *Cancer Res* **70**, 1154-63 (2010).

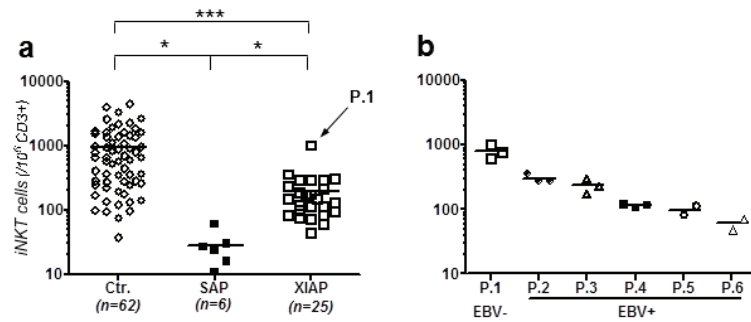


Figure 1

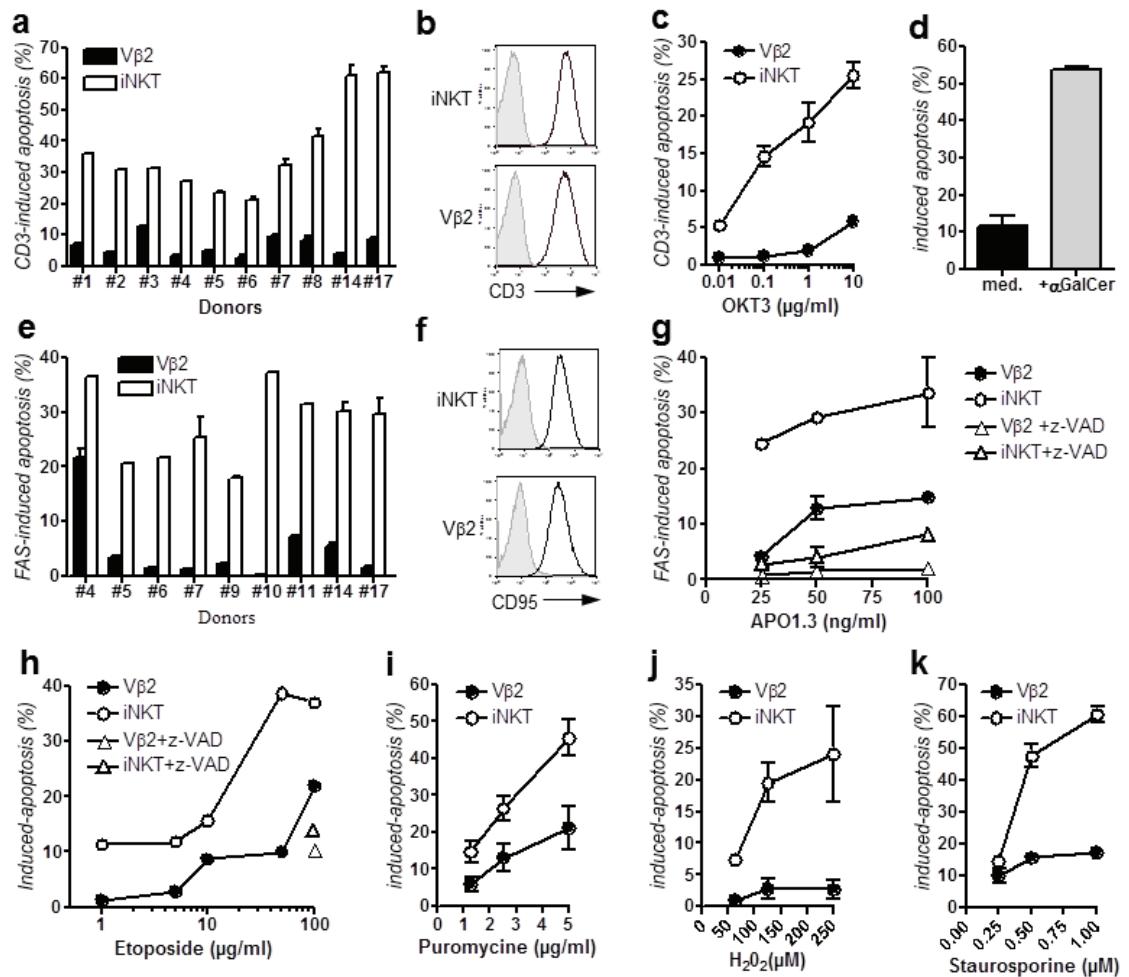


Figure 2

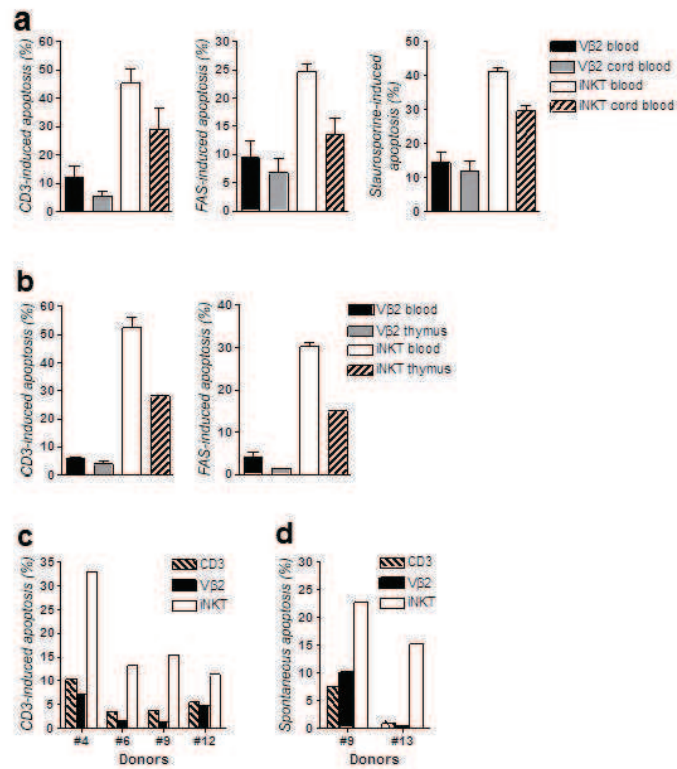


Figure 3

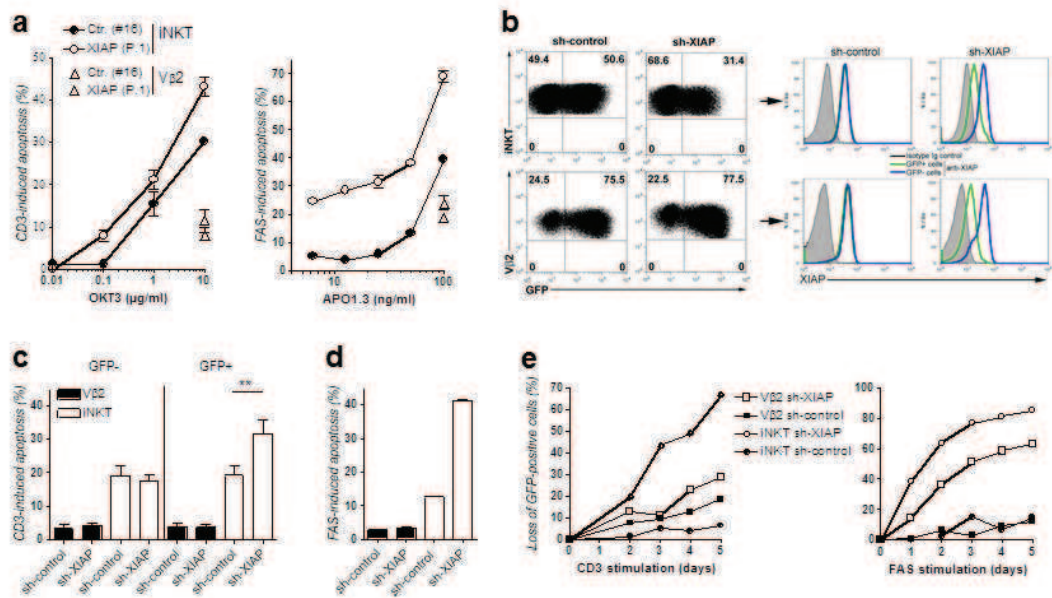


Figure 4



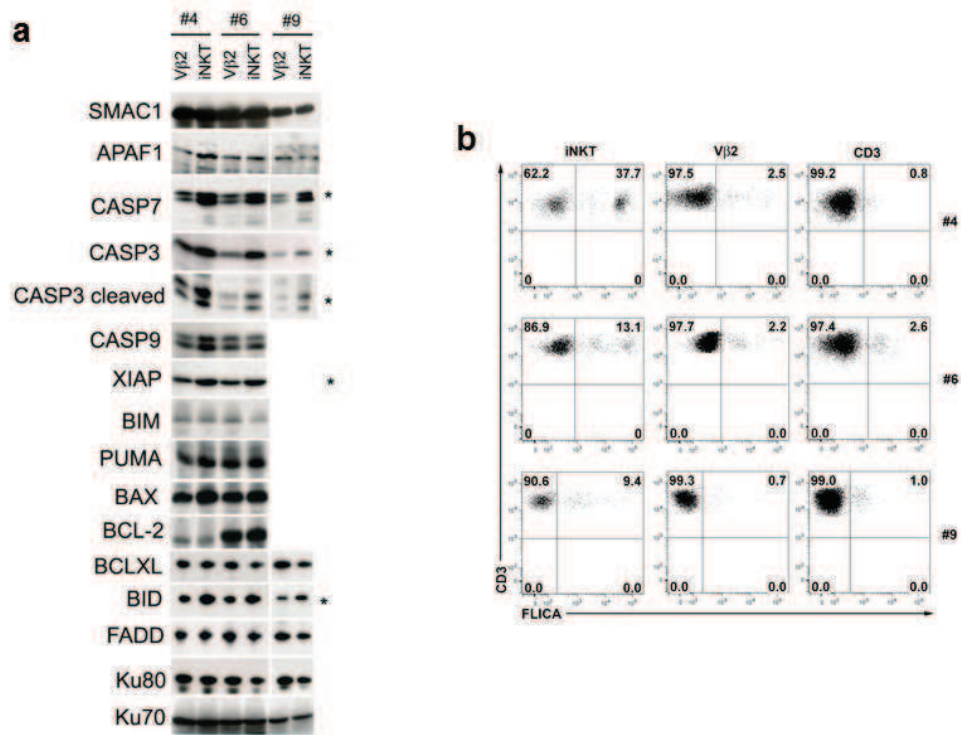


Figure 5

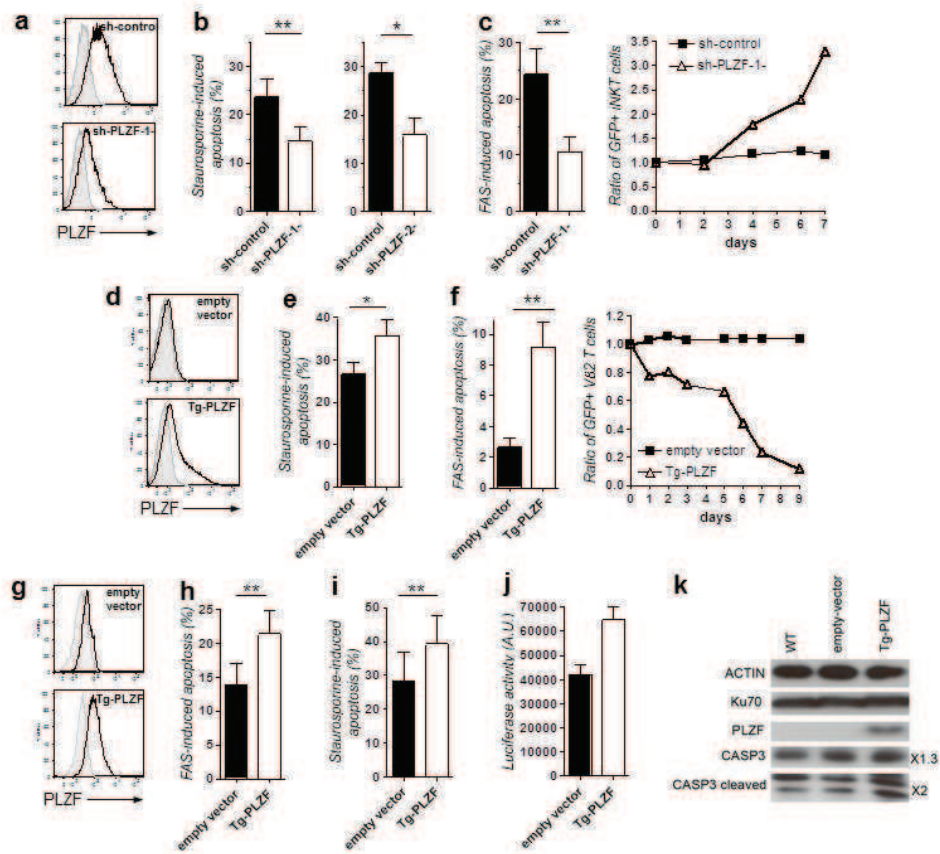


Figure 6

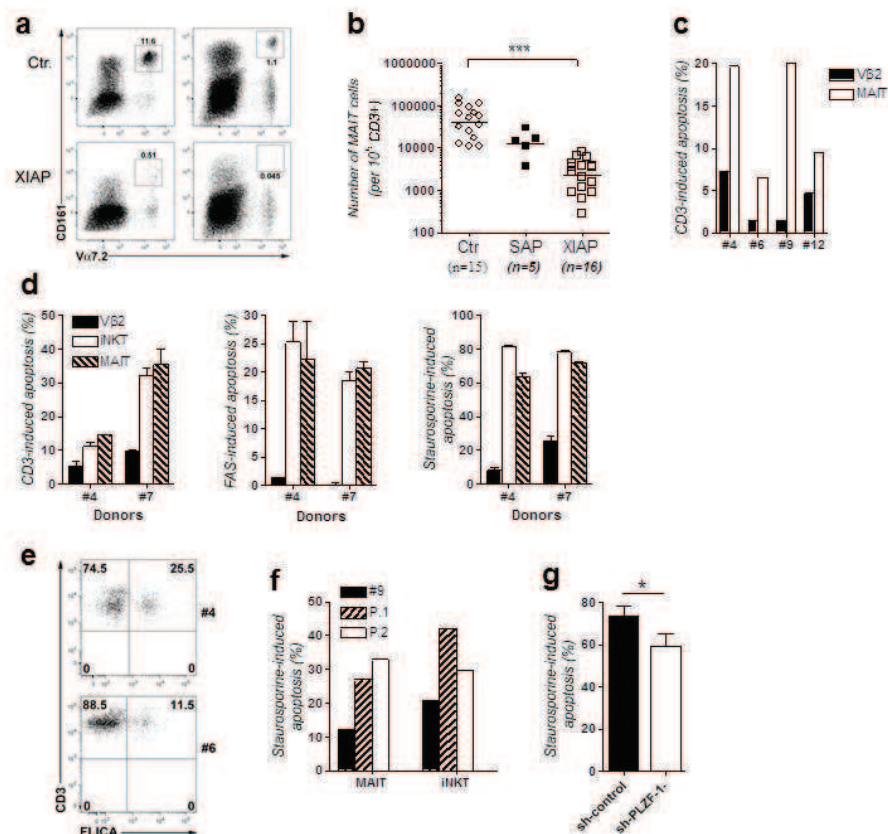


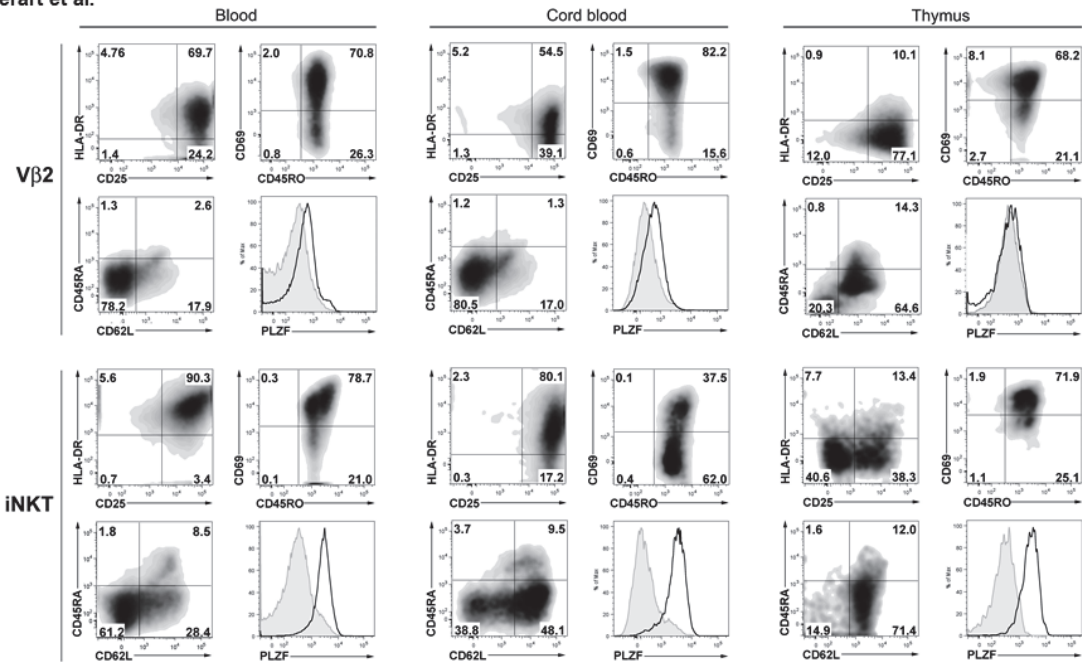
Figure 7

Gérart et al.

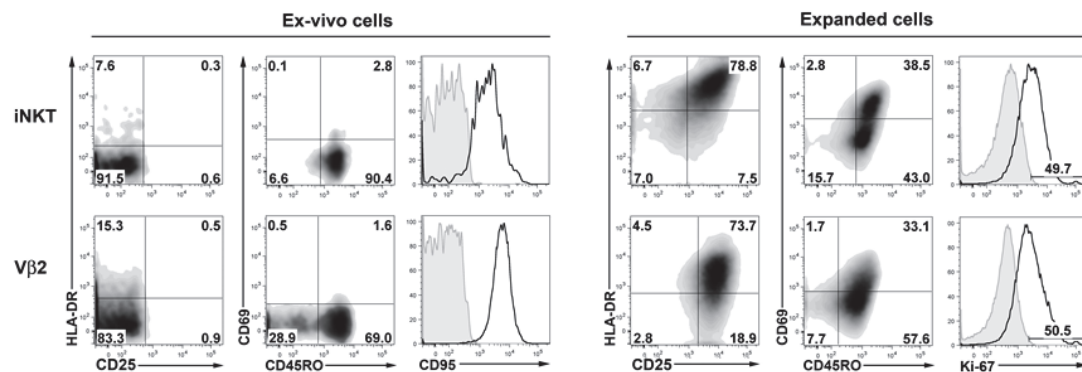
Healthy donors	iNKT/10 <sup>6</sup> CD3 <sup>+</sup>	Vβ2(%CD3 <sup>+</sup> )
#1	2800	8,5
#2	840	7,7
#3	7200	ND
#4	3610	8
#5	1200	4,1
#6	4400	4
#7	587	8,7
#8	30	7,2
#9	4680	7
#10	710	8,3
#11	ND	ND
#12	18600	6,7
#13	3060	ND
#14	474	9,5
#15	400	ND
#16	2930	6
#17	375	ND
#18	630	10,6
#19	ND	ND
#20	710	8,4

ND: not done

**Supplementary Table 1.** Analysis of the frequencies of iNKT and Vβ2 T cells in PBMCs of the different healthy donors that have been tested in the study.

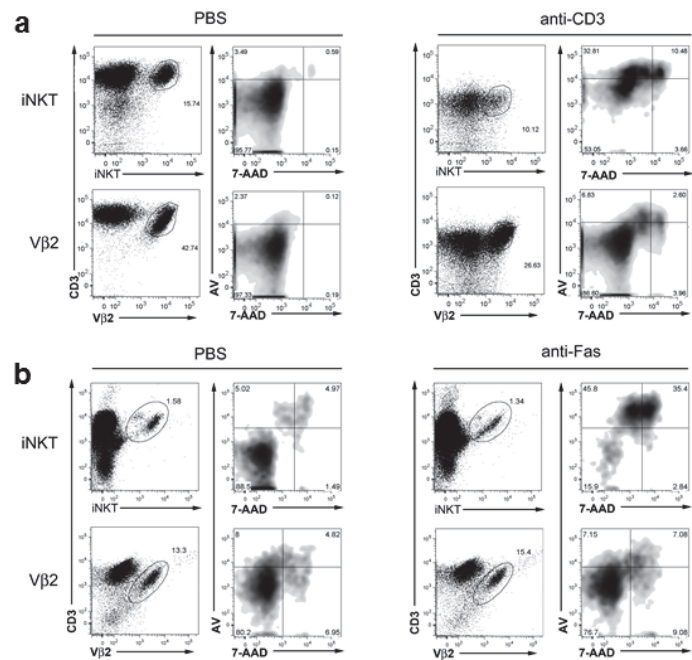


**Supplementary Figure 1.** Cord blood and thymus derived iNKT cells were less of memory-activated effector phenotype than cells expanded from peripheral blood. Expression of HLA-DR, CD25, CD69, CD45-RO, CD45-RA, CD62L and PLZF on iNKT cells and Vβ2 T cells expanded from peripheral blood, cord-blood or thymus after gating on CD3<sup>+</sup>TCR-iNKT<sup>+</sup> (iNKT) and CD3<sup>+</sup>TCRVβ2<sup>+</sup> (Vβ2). One representative experiment of five for peripheral blood with five different donors. One representative experiment of three for cord-blood with three different donors. One experiment for thymus cells.

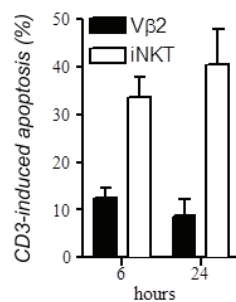


**Supplementary Figure 2.** Fresh iNKT cells and Vβ2 T cells have a memory phenotype and are not activated in contrast to expanded cells that are activated and cycling. Expression of HLA-DR, CD25, CD69, CD45-RO, CD95 and Ki-67 by flow cytometry on fresh ex-vivo (left panels) and expanded (right panels) iNKT and Vβ2 T cells after gating on CD3<sup>+</sup>TCR-iNKT<sup>+</sup> (iNKT) and CD3<sup>+</sup>TCRVβ2<sup>+</sup> (Vβ2) from one healthy donor. Data correspond to one representative experiment of five with five different donors.

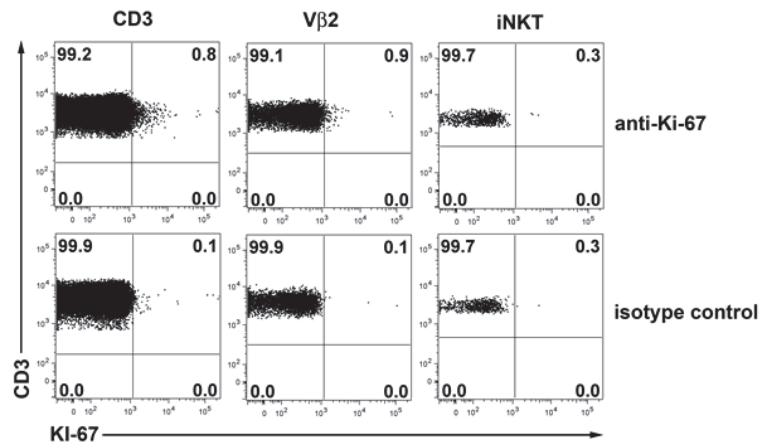




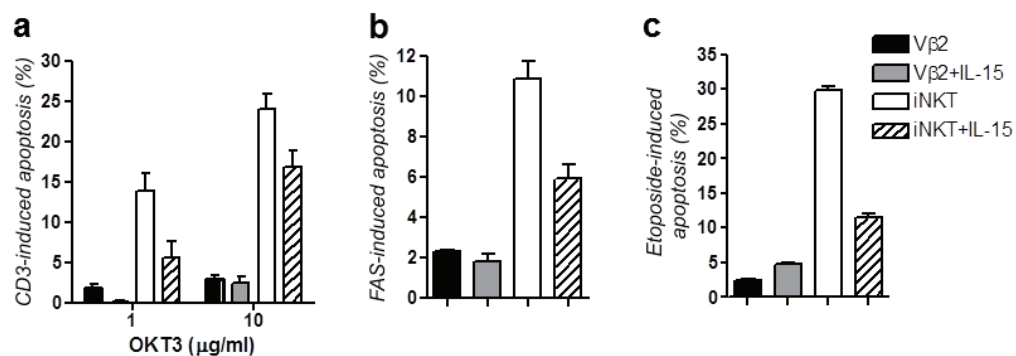
**Supplementary Figure 3.** Representative flow cytometry plots showing gating strategies for detection of apoptosis. **(a)** Expanded iNKT cells and Vβ2 T cells from one healthy donor were stimulated with coated anti-CD3 antibody (10μg/ml) (Clone OKT3) for 24 h. Apoptotic iNKT cells or Vβ2 T cells were detected by staining with Annexin V and 7-AAD after gating on CD3<sup>+</sup>TCR-iNKT<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>TCRVβ2<sup>+</sup>, respectively. **(b)** Expanded iNKT cells and Vβ2 T cells from one healthy donor were stimulated with soluble anti-FAS (100ng/ml) (Clone APO1.3) antibody for 24 h. Apoptotic iNKT cells or Vβ2 T cells were detected by staining with annexin V and 7-AAD after gating on CD3<sup>+</sup>CD1d-TT<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>TCRVβ2<sup>+</sup>, respectively.



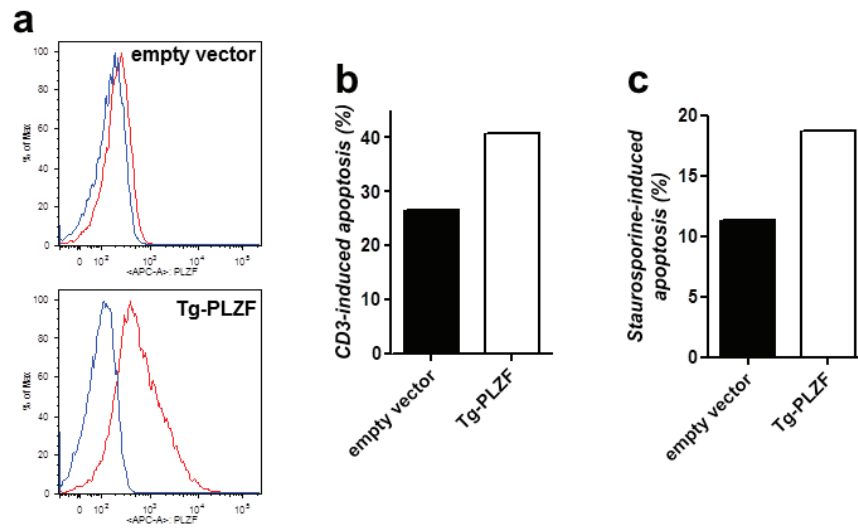
**Supplementary Figure 4.** Increased activation induced-cell death of iNKT cells is detectable as early as 6 hours. Apoptosis of expanded iNKT and Vβ2 T cells stimulated with anti-CD3 antibody for six and twenty-four hours. Data are means±s.d. of four experiments with four different healthy donors (#1, #3, #6, #19).



**Supplementary Figure 5.** iNKT and Vβ2T cells are not cycling cells in vivo. The expression of Ki-67 was detected by intracellular staining with anti-Ki-67 antibodies in fresh T cells (CD3), Vβ2 T cells (Vβ2) and iNKT cells. One representative experiment of three.



**Supplementary Figure 6.** IL-15 partially reverts the pro-apoptotic phenotype of iNKT cells. Apoptosis of iNKT and Vβ2 T cells from one healthy donor (#4) expanded in the presence or not of IL-15 (50ng/ml). Cells were stimulated with (a) anti-CD3 antibody (clone OKT3), (b) anti-FAS antibodies (clone APO1.3) or (c) etoposide for 24h. Assays were done in duplicate (error bars).



**Supplementary Figure 7.** Overexpression of the transcription factor PLZF increases the susceptibility to apoptosis of T cell blasts. **(a)** Expression of PLZF in T cell blasts infected by a lentiviral empty vector (empty vector) or containing a PLZF transgene (Tg-PLZF). Blue lines, isotype control; red lines, anti-PLZF. **(b)** CD3-induced apoptosis in T cell blasts expressing PLZF (Tg-PLZF) or not (empty vector). **(c)** Staurosporine-induced apoptosis in T cell blasts infected by a lentiviral empty vector (empty vector) or containing a PLZF transgene (Tg-PLZF).

## **IX. ARTICLE SOUS PRESSE :**

Les signaux émanant du récepteur à l'antigène des cellules T (TCR) sont requis pour le développement et la fonction des cellules T. La tyrosine-kinase LCK qui est spécifique des cellules T fait partie de la machinerie de signalisation du TCR. En se basant sur sa fonction, nous avons considéré *LCK* comme un gène candidat pour des patients atteints de déficit immunitaire combiné.

Nous identifions et décrivons ici un enfant avec une immunodéficiency T causée par une mutation homozygote faux-sens du gène *LCK* (c.1022T>C) résultant d'une disomie uniparentale. Des analyses génétiques, moléculaires et fonctionnelles ont été effectuées afin de caractériser la déficiency en LCK. La protéine mutante LCK (p.L341P) est faiblement exprimée, n'a pas d'activité kinase et est incapable de restaurer une signalisation normale du TCR dans une lignée dépourvue de LCK. La patiente présente des infections récurrentes du tractus respiratoire avec des manifestations inflammatoires et auto-immunes. La patiente a une lymphopénie T CD4<sup>+</sup> et une expression de surface faible de CD4 et CD8. Les lymphocytes T résiduels ont un répertoire oligoclonal et montrent un défaut sévère de la signalisation par le TCR, avec de faibles signaux de phosphorylation et un défaut de flux calcique suite à une stimulation du TCR.

Nos résultats identifient donc une nouvelle forme de déficit immunitaire T causée par un défaut dans le gène *LCK* montrant ainsi le rôle essentiel de LCK dans le développement et la fonction des cellules T. De plus, nos données indiquent qu'un défaut de la signalisation du TCR peut résulter en une différenciation et une fonction anormales des cellules T résultant en un risque important d'inflammation et d'auto-immunité. Les patients souffrant d'une lymphopénie T CD4<sup>+</sup> et ayant des expressions diminuées de CD4 et CD8 associées à des manifestations auto-immunes ou inflammatoires devraient ainsi être considérés pour un déficit immunitaire causé par une déficiency en LCK.

1 *For JACI, Original article, Revised*

2 **Title:** Primary T-cell immunodeficiency with immunodysregulation caused by autosomal  
3 recessive LCK deficiency

4  
5 Fabian Hauck, MD,<sup>a,b</sup> Clotilde Randriamampita, PhD,<sup>c</sup> Emmanuel Martin, PhD,<sup>a</sup> Stéphane Gerart  
6 PhD,<sup>a</sup> Nathalie Lambert, AS,<sup>d</sup> Annick Lim, MS,<sup>e</sup> Jean Soulier, MD, PhD,<sup>f</sup> Zosia Maciorowski,  
7 BS,<sup>g</sup> Fabien Touzot, MD, PhD,<sup>h</sup> Despina Moshous, MD,<sup>h</sup> Pierre Quartier, MD,<sup>h,h</sup> Sébastien  
8 Heritier, MD,<sup>h,h</sup> Stéphane Blanche, MD,<sup>h,h</sup> Frédéric Rieux-Laucat, PhD,<sup>a</sup> Nicole Brousse, MD,<sup>h,i</sup>  
9 Isabelle Callebaut, PhD,<sup>j</sup> André Veillette, MD,<sup>k</sup> Claire Hivroz, PhD,<sup>l</sup> Alain Fischer, MD, PhD,<sup>a,h,h</sup>  
10 Sylvain Latour, PhD,<sup>a,m,\*</sup> and Capucine Picard, MD, PhD<sup>h,d,m,n</sup>

11 From

12 <sup>a</sup>INSERM 768, Laboratoire du Développement Normal et Pathologique du Système Immunitaire,  
13 Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France, EU

14 <sup>b</sup>Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Paris, France, EU

15 <sup>c</sup>INSERM 567-CNRS UMR 8104, Institut Cochin, Paris, France, EU

16 <sup>d</sup>Centre d'Etude des Déficiences Immunitaires, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance  
17 Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France, EU

18 <sup>e</sup>Unité de Régulation Immunitaire et Vaccinologie, Institut Pasteur Paris, France, EU

19 <sup>f</sup>INSERM 944-CNRS UMR 7212, Hôpital Saint-Louis, AP-HP, Paris, France, EU

20 <sup>g</sup>Flow Cytometry Core Facility, Institut Curie, Paris, France, EU

21 <sup>h</sup>Unité d'Immunologie et Hématologie Pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP,  
22 Paris, France, EU

23 <sup>i</sup>Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital Necker-Enfants Malades, AP-HP,  
24 Paris, France, EU

25 <sup>j</sup>Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés, CNRS UMR 7590, Universités  
26 Pierre et Marie Curie et Paris Diderot, Paris, France, EU

27 <sup>k</sup>Molecular Oncology Research Unit, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal,  
28 Québec, Canada,

29 <sup>l</sup>INSERM 932, Institut Curie, Paris, France, EU

30 <sup>m</sup>INSERM 980, Laboratory of Human Genetics of Infectious Disease, Necker Enfants Malades  
31 Branch, Paris, France, EU

32

33 \*These authors contributed equally

34 \*Corresponding author: Telephone: 33 1 44 49 50 51; Fax: 33 1 42 73 06 40;

35 [sylvain.latour@inserm.fr](mailto:sylvain.latour@inserm.fr); INSERM 768, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149 rue de Sèvres,  
36 Paris 75015, France, EU

37

- 38 Supported by grants from INSERM, ANR (ANR-08-MIEN-012-01) (France) and from the  
39 European Research Council (ERC-2009-AdG\_20090506 n°FP7-249816).



#### 40 Abstract

41 **Background:** Signals emanating from the T-cell antigen receptor (TCR) are required for T-cell  
 42 development and function. The T lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK) is a key  
 43 component of the TCR signaling machinery. On the basis of its function, we considered *LCK* a  
 44 candidate gene in patients with combined immunodeficiency (CID).  
 45 **Objective:** We identify and describe a child with a T-cell immunodeficiency caused by a  
 46 homozygous missense mutation of the *LCK* gene (c.1022T>C) resulting from uniparental  
 47 disomy. **Methods:** Genetic, molecular and functional analyses are performed to characterize the  
 48 LCK deficiency and the associated clinical and immunologic phenotypes are reported.  
 49 **Results:** The mutant LCK protein (p.L341P) was weakly expressed with no kinase activity and  
 50 failed to reconstitute TCR signaling in LCK-deficient T cells. The patient presented with  
 51 recurrent respiratory tract infections, together with predominant early-onset inflammatory and  
 52 autoimmune manifestations. The patient displayed CD4<sup>+</sup> T cell lymphopenia and low levels of  
 53 CD4 and CD8 expression on the surface of T cells. The residual T lymphocytes had an oligoclonal  
 54 T-cell repertoire and exhibited a profound TCR signaling defect, with only weak tyrosine  
 55 phosphorylation signals and no Ca<sup>2+</sup> mobilization in response to TCR stimulation.  
 56 **Conclusion:** Together, we report a new form of T-cell immunodeficiency caused by an *LCK*  
 57 gene defect, highlighting the essential role of LCK in human T-cell development and responses.  
 58 Our results also point out that defects in the TCR signaling cascade often result in abnormal T-  
 59 cell differentiation and functions leading to an important risk factor for inflammation and  
 60 autoimmunity.

## 61 **Clinical implications**

62 Patients, with CD4 T lymphopenia and decreased CD4 and CD8 expression associated with  
 63 reccurent infections and autoinflammatory manifestations, should be tested ~~in consideration of~~  
 64 ~~genetic immunodeficiency~~ for LCK deficiency.

## 65 **Capsule summary**

66 We report a new form of T-cell immunodeficiency caused by an *LCK* genetic defect,  
 67 characterized by a CD4 T lymphopenia and decreased expression of CD4 and CD8. LCK  
 68 deficiency resulted in defective T-cell receptor signaling leading to to reccurent infections,  
 69 inflammation and autoimmunity.

## 70 **Key words**

71 CD4, lymphopenia, autoinflammation, recurrent infections, LCK tyrosine kinase, genetic defect,  
 72 immunodeficiency, T-cell receptor, signaling

## 73 **Abbreviations used**

74 AICD: Activation-induced cell death  
 75 CDR3: Complementary determining region 3  
 76 ERK: extracellular signal-regulated kinase  
 77 ITAM: Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs  
 78 LCK: Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase  
 79 NF- $\kappa$ B: Nuclear factor kappa B  
 80 PBMC: Peripheral blood mononuclear cells  
 81 PID: Primary immunodeficiency  
 82 SLP-76: SH2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa  
 83 TCR: T cell antigen receptor  
 84 EMRA: Exhausted effector memory T cells

- 85 TRA/B/G/DV: T cell receptor " /#/\$/%locus variable segment
- 86 TRA/B/G/DC: T cell receptor " /#/\$/%locus constant segment
- 87 TReg: Regulatory T cells
- 88 UPD: Uniparental disomy
- 89 WT: wild-type
- 90 ZAP-70: zeta-chain associated protein tyrosine kinase of 70 kDa

## 91 **Introduction**

92 TCR signaling is essential for T-cell development and their peripheral activation, both of which  
 93 are required for an appropriate immune response.<sup>1,2</sup> Defects in TCR-mediated signals can result  
 94 in developmental and functional T-cell abnormalities leading to immunodeficiencies.<sup>3</sup> The first  
 95 detectable signaling event after TCR engagement is the tyrosine phosphorylation of tyrosine-  
 96 based activation motifs (ITAMs) in the cytoplasmic domains of the transducing subunits of the  
 97 TCR-CD3 complex. ITAMs are mostly phosphorylated by the SRC family tyrosine kinase LCK  
 98 and, to a lesser extent, by FYN, another SRC family kinase. LCK is constitutively associated  
 99 with the T-cell coreceptors CD4 and CD8 and is activated following co-engagement with the  
 100 TCR, upon MHC-peptide recognition.<sup>4,5</sup> Afterwards, the  $\zeta$ -chain associated protein tyrosine  
 101 kinase of 70 kDa (ZAP-70) is activated upon recruitment to the phosphorylated ITAMs and  
 102 subsequent phosphorylation by LCK. This allows for the assembly of the LAT-SLP-76  
 103 signalosome that coordinates further amplification and diversification of the initial TCR signals  
 104 via enzymes, second messengers and transcription factors, which in turn activate the T cell. These  
 105 events include inositol 3 phosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG) production,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$   
 106 mobilization, activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and nuclear translocation  
 107 of nuclear factor  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) and nuclear factor of activated T cells (NFAT). In human, several  
 108 primary defects of components of the TCR signaling cascade, including CD3 subunits, ZAP-70,  
 109 ITK, ORAI-1, STIM1 and MAGT1 have been reported to cause combined immunodeficiency  
 110 (CID).<sup>3,6-9</sup> These defects result in low or normal numbers of T cells, with altered functions,  
 111 leading to a severe susceptibility to infections and immune dysregulation, such as autoimmunity  
 112 and inflammation. Also, three case reports of CID associated with altered LCK protein  
 113 expression have been reported today.<sup>10-12</sup> However, in these patients no mutation in *LCK* was  
 114 identified raising the possibility that these CID did not result from a primary defect in *LCK*. We

- 115 describe here the first case of autosomal recessive (AR) LCK deficiency in a child who displayed
- 116 a severe T-cell immunodeficiency, resulting in recurrent infections and severe inflammation.



## 117 **Methods**

118 Detailed procedures of materials and methods are provided in the online Supplemental Methods  
119 (see the Online Repository).

120

121 **Patient.** We obtained written informed consent for participation in the study from the parents of  
122 the patient. This study was approved by the institutional review board at Necker-Enfants Malades  
123 Hospital and all experiments were carried out in accordance with the Helsinki Declaration.

124

125 **Histology.** Skin biopsy specimens were fixed in formalin, embedded in paraffin and stained  
126 according to standard hematoxylin-eosin staining protocols.<sup>13</sup>

127

128 **Immunological investigations.** Flow-cytometry-based phenotype analysis and assays of  
129 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) proliferation were performed according to standard  
130 protocols as previously described.<sup>7, 14</sup>

131

132 **Flow cytometry.** Cells were labeled according to standard protocols.<sup>15</sup> In apoptosis assays,  
133 apoptotic cells were labeled by annexin V in combination with 7-AAD Viaprobe (BD  
134 Biosciences) according to standard protocols.<sup>15</sup>

135

136 **Cells.** Peripheral blood samples were collected from the patient and healthy donors and PBMCs  
137 were isolated by Ficoll-Paque density gradient using standard procedures.<sup>15</sup>

138

139 **Immune complex kinase assays.** Assays were done as described before.<sup>16</sup>

140



141 **Cell stimulations and immunoblotting.** T-cell blasts were stimulated then lysed and  
 142 immunoblots were performed as described.<sup>16</sup> Activation-induced cell death was analyzed as  
 143 previously described.<sup>17</sup>

144

145 **Ca<sup>2+</sup> responses.** Ca<sup>2+</sup>-responses were assessed by flow cytometry, fluorescence imaging and  
 146 spectrofluorimetry, respectively, as previously described.<sup>14, 18, 19</sup>

147

148 **T cell repertoire.** Real-time quantitative analysis of the T cell repertoire, CDR3 length analysis  
 149 by immunoscope technique and CDR3 sequencing were performed from PBMCs, as previously  
 150 described.<sup>20</sup>

151

152 **Mutation and genetic analyses.** Genomic DNA was isolated from cells according to standard  
 153 protocols. Polymerase chain reaction was carried out with oligonucleotide primers specific for the  
 154 flanking regions of the LCK protein-coding exons. Chip-based single nucleotide polymorphism  
 155 and array-CGH analyses were carried out according to standard protocols.<sup>21</sup>

156

157 **Plasmid constructs and cell transfections and infections.** The description of the plasmid  
 158 constructs and cDNAs used is available on line (see the Online Repository). HEK 293-T cells and  
 159 JCaM 1.6 cells expressing wild-type (wt) LCK or mutated L341P LCK were obtained by  
 160 transfection and infection respectively, as previously described.<sup>17</sup>

## 161 Results

### 162 Clinical features

163 We examined a child presenting recurrent respiratory tract infections and diarrhea. The patient  
 164 was conceived by *in vitro* fertilization and was born, at term, to healthy non consanguineous  
 165 parents from France. Her birth weight was normal and she was vaccinated at birth with BCG,  
 166 with no adverse effect. She had received four 7-valent conjugate vaccines against pneumococcus  
 167 and four pentavalent vaccinations against *H. influenzae* type b, Diphtheria, Bordetella pertussis,  
 168 tetanus and poliovirus at the age of 2, 4, 6 and 14 months. She also received two immunizations  
 169 against Measles, Rubella and Mumps without adverse effect at 12 and 16 months. From the age  
 170 of 15 months, she developed undocumented protracted diarrhea, resulting in a failure to thrive  
 171 (minus 1 Standard Deviation (SD) for weight and minus 2 SD for height at the age of two years).  
 172 She presented recurrent upper and lower undocumented respiratory tract infections, including  
 173 pneumonia complicated by pneumatocele. Upper airway endoscopy showed congestive and  
 174 ulcerative inflammation of the nasal, sinusoidal, pharyngeal and laryngeal mucosae. The upper  
 175 airway mucosal damages were the consequences of recurrent infections and local inflammation.  
 176 ENT biopsy was not carried out because of dyspnea severity, gut endoscopy and gut biopsies  
 177 were normal. At the age of 22 months, the patient began to suffer from daily fever spikes,  
 178 accompanied by multiple nodular skin lesions and inflammation of the interphalangeal joints of  
 179 the right index finger (supplemental Fig E1, A). A skin biopsy of nodule showed the epidermis was  
 180 normal, but in the dermis and most importantly in the hypodermis, cellular infiltrations were  
 181 presented consisting of macrophages (CD86+), CD3+CD8- T cells and histiocytic cells with  
 182 large cytoplasm (supplemental Fig E1, B and data not shown). Large foci of neutrophilic necrosis  
 183 were also found in hypodermis compatible with the diagnosis of lobular and septal neutrophilic  
 184 panniculitis with necrosis and abscesses with rare giant-cellular cells with no microbial

185 identification (supplemental Fig E1, C). No granulomatous lesions were seen in the skin and the  
 186 clonality was not evaluated. Intensive antibacterial, antimycobacterial and antifungal treatments  
 187 initiated at the age of 24 months had no effect on fever and skin lesions. The patient also received  
 188 prophylactic intravenous immunoglobulin (Ig) and trimethoprim-sulfamethoxazole. Two months  
 189 later, she developed polyserositis (ascites and pericarditis) with capillary leak syndrome, and  
 190 ophthalmologic assessment disclosed retinal vessel vasculitis. Immunosuppressive treatment with  
 191 glucocorticoids had a transient effect on fever and skin lesions, but both these signs subsequently  
 192 recurred. Anti-TNF antibody treatment led to apyrexia and a partial regression of skin lesions and  
 193 serositis. At the age of 29 months, the patient presented normocytic regenerative anemia,  
 194 peripheral thrombocytopenia and anti-platelet autoantibodies were detected. At the age of 30  
 195 months, she underwent allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) from a  
 196 matched unrelated donor. Unfortunately, she died at day 7 post-HSCT of pulmonary and hepatic  
 197 veno-occlusive disease.

198

#### 199 **Immunological phenotype**

200 Immunological investigations for the patient at 23 and 29 months are summarized in Table 1. The  
 201 child had profound CD4<sup>+</sup> T-cell lymphopenia, with a low proportion of TCR<sup>β</sup><sup>+</sup> cells and a high  
 202 proportion of TCR<sup>β</sup><sup>+</sup> cells. B and NK cell counts were normal or slightly low. Further flow  
 203 cytometry analyses of PBMCs showed that most of the CD4<sup>+</sup> T cells of the patient had a central  
 204 memory phenotype (CD45RO<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), whereas the CD8<sup>+</sup> T cells were exhausted  
 205 effector memory cells (CD45RO<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>; also termed EMRA T cells) (Table 1  
 206 and supplemental Fig E2, A).<sup>22</sup> Most of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were CD95<sup>+</sup> suggesting that they  
 207 have been activated. In contrast, the majority of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells of a healthy control  
 208 donor had a naïve and non activated phenotype. The percentages of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>



209 and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cells that correspond to regulatory T cells (Treg) were similar to  
 210 those of a healthy control donor and in a normal range (3-15%) (supplemental Fig E3).<sup>7, 14</sup> In the  
 211 patient, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> T cells with low CD25 expression (FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>dim</sup>) were in high  
 212 proportions which might represent activated T cells including Treg.<sup>23</sup> However, the absolute  
 213 number of Treg (CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>) cells in the patient is strongly reduced because of the CD4<sup>+</sup>  
 214 lymphopenia.

215 Real-time quantitative PCR analysis of the repertoire of TCR $\alpha$  and TCR $\beta$  cells of the  
 216 patient revealed an abnormal and restricted repertoire, with an enrichment of cells expressing the  
 217 V $\alpha$  TRAV9, V $\beta$  TRBV6a, V $\beta$  TRGV5 and V $\beta$ TRDV1 segments (supplemental Fig E4, A-B).  
 218 Subsequent analysis of the complementarity determining region 3 (CDR3) length and direct  
 219 sequencing of the CDR3 demonstrated an oligoclonal repertoire with >90% of TCR $\alpha$  cells  
 220 expressing the same V $\alpha$  TRAV9J6 and V $\beta$  TRBV6aD2J2 rearrangements with identical CDR3  
 221 sequences. Furthermore, >70% of TCR $\beta$  cells expressing the V $\beta$ TRDV1 segment were found to  
 222 have the same rearrangement V $\beta$ TRDV1J1 with the same CDR3 sequence (data not shown).  
 223 Flow cytometry analysis confirmed that >80% of the CD8<sup>+</sup> T cells in PBMCs of the patient  
 224 expressed V $\beta$  TRBV6a (also named V $\beta$ 13a in the Arden nomenclature), whereas this segment  
 225 was expressed by only 6% of CD4<sup>+</sup> T cells of the patient and by only 1.4% of the CD8<sup>+</sup> T cells of  
 226 a healthy control (supplemental Fig E2, B). Similarly, flow cytometry analysis of TCR $\beta$  cell  
 227 populations in PBMCs of the patient showed a skewed repertoire with accumulation of  $\beta$ T cells  
 228 expressing V $\beta$ TRDV1 (V $\beta$ 4) which have been shown to represent tissue resident  $\beta$ T-cells.<sup>24</sup>  
 229 Also, a majority (64.3%) of the TCR $\beta$  cells were CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> in the patient (supplemental Fig  
 230 E2, C). In contrast and as expected, most of TCR $\beta$  cells of the healthy control were CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>

231 and expressed V%TRDV2 (V%2), corresponding to circulating %T cells (supplemental Fig E2,  
232 C). These observations indicate the patient's T cell repertoire is restricted and oligoclonal.

233 Strikingly, we noticed that primary T cells of the patient displayed a selective decrease  
234 in the surface expression of CD4 and CD8 when compared to T cells from a healthy control (Fig  
235 1). This diminished expression of CD4 and CD8 was also observed in T-cell blasts expanded in  
236 vitro from PBMCs of the patient (Fig 1). T-cell proliferation in response to phytohemagglutinin  
237 (PHA), anti-CD3 antibody or immunization antigens was abolished, but proliferation was  
238 preserved in response to phorbol myristate acetate (PMA) and ionomycin, suggesting a proximal  
239 defect in TCR-mediated activation (Table 1). IgM levels were high, whereas IgG, IgA and IgE  
240 levels were in the normal range. However, levels of antibodies against immunization antigens  
241 were low, despite compliance with the recommended vaccination schedule (Table 1).  
242 Autoantibodies, such as anti-nuclear antibodies, anti-ds DNA antibodies and rheumatoid factor,  
243 were detected (Table 1).

244

#### 245 **LCK deficiency**

246 Overall, these data were indicative of a profound T-cell immunodeficiency. Based on the low  
247 levels of CD4 and CD8 expression on the T cells of mice lacking *lck* (*lck*<sup>-/-</sup>)<sup>25</sup>, we considered the  
248 possibility of LCK deficiency as a cause of the immunodeficiency in the patient. An analysis of  
249 the sequence of the coding exons of the *LCK* gene in DNA from PBMCs' patient revealed a  
250 homozygous T to C nucleotide transition at position 1022 (c.1022T>C, NCBI Reference  
251 Sequence: NM\_001042771.1) in exon 9 (Fig 2, A). This mutation resulted in an amino-acid  
252 substitution (p.L341P, NCBI Reference Sequence: NP\_001036236) in the LCK kinase domain  
253 (Fig 2, B) and was not found in databases (NCBI, UCSC, 1094 from the 1000 genomes project  
254 and 5379 exomes from the NHLBI exome sequencing project). The patient's mother was found



255 to be heterozygous for the mutation, whereas her father and fetal sibling did not carry the  
 256 mutation (Fig 2, *A*). To further understand the genetic mechanism leading to the homozygosity of  
 257 the c.1022T>C in *LCK* in the patient, chip-based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis  
 258 and array comparative genomic hybridization (a-CGH) of the patient's genomic DNA were  
 259 carried out (Fig 2, *C* and data not shown). These experiments showed that the patient had two  
 260 copies of the entire maternal chromosome 1 (carrier of the c.1022T>C mutation in *LCK*). The  
 261 sequencing of *LCK* was also carried out in patient's fibroblasts and the homozygous *LCK* c.1022  
 262 T>C mutation was detected excluding the possibility a somatic event confined to PBMCs.  
 263 Therefore, a complete maternal uniparental isodisomy (UPD) accounts for the homozygosity of  
 264 the *LCK* mutation in the patient.

265 The L341P substitution affects a phylogenetically-conserved alpha-helix (338-357), close  
 266 to the active site at position 364 (supplemental Fig E7). The alignment of the catalytic domain of  
 267 different members of the tyrosine kinase superfamily shows that L341 occupies a highly  
 268 conserved position, where the hydrophobicity is maintained, suggesting a crucial role to stabilize  
 269 the structure. The 3D structure analysis of the catalytic domain of *LCK* confirmed that L341 is  
 270 buried and belongs to a cluster of hydrophobic amino acids, especially making a critical contact  
 271 with the lateral chain of I433 in the opposite alpha-helix, as well as with two leucine residues  
 272 (Fig 3, *A*). Thus, the L341P substitution is likely to affect the fold. Moreover, the substitution  
 273 towards a proline would interrupt the local hydrogen bond network of the alpha-helix,  
 274 contributing to an additional destabilization of the local 2D structure. Strengthening these  
 275 observations, informatic programs (CUPSAT (<http://cupsat.tu-bs.de/cupsat/existingpdb.htm>),  
 276 PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) and SIFT (<http://sift.jcvi.org>) predict the  
 277 L341P mutation to be highly damaging given an unfavorable structure that destabilizes the  
 278 protein.



279 Expression of the mutant form of LCK p.L341P was next examined in cells of the patient  
 280 and in transiently expression experiments. Western-blot analysis of LCK levels in PBMCs and T-  
 281 cell blasts from the patient showed that mutated form levels in these cells were much lower than  
 282 of wild-type (wt) LCK levels in control cells (Fig 3, *B* and Fig 4, *C*). Similar low levels of  
 283 p.L341P LCK protein were observed in transient expression experiments in HEK 293-T cells (Fig  
 284 3, *B*). In contrast to wt LCK, which migrated as two distinct protein species, with the upper  
 285 corresponding to post-translationally-modified LCK, p.L341P LCK form resolved into a unique  
 286 product corresponding to non-modified proteins. The kinase activity of the p.L341P LCK protein  
 287 was further examined in HEK 293-T cells and compared to that of wt LCK. For this purpose, the  
 288 kinase autophosphorylation in immune complex kinase assays was analyzed after  
 289 immunoprecipitation of different amounts of p.L341P LCK protein or wt LCK (Fig 3, *C*). In  
 290 these conditions, the p.L341P LCK protein kinase activity was not detectable, whereas such  
 291 activity was detected for wt LCK. Thus, these data demonstrate that the L341P substitution  
 292 decreases the stability of the LCK protein and abolishes its kinase activity, resulting in LCK  
 293 deficiency.

294

#### 295 **Defective early TCR signaling in p.L341P LCK -expressing cells**

296 Further biochemical analyses of TCR signaling were carried out with ex vivo T cells and T-cell  
 297 blasts from the patient and a healthy control. T-cell blasts were expanded in response to PMA  
 298 and ionomycin stimulation, to circumvent the defect in TCR-mediated proliferation of T cells  
 299 expressing the p.L341P LCK protein (Fig 4). We first analyzed TCR-induced intracellular  $\text{Ca}^{2+}$   
 300 mobilization, a crucial inducer of T-cell activation downstream from the tyrosine phosphorylation  
 301 signals.<sup>2</sup> Stimulation with anti-CD3 antibody induced no intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization in either  
 302 fresh ex vivo  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$  T cells (Fig 4, *A*) or in T-cell blasts from the patient (Fig 4, *B*),

303 whereas it resulted in  $\text{Ca}^{2+}$ -flux in control cells from a healthy donor. By contrast, stimulation  
 304 with ionomycin and thapsigargin induced a marked  $\text{Ca}^{2+}$ -flux in the cells of both the patient and  
 305 the control.

306 We next analyzed TCR-induced tyrosine phosphorylation signals in the T-cell blasts of  
 307 the patient. Stimulation with anti-CD3 antibody, followed by an analysis of tyrosine-  
 308 phosphorylated proteins revealed that levels of the tyrosine-phosphorylated proteins known to be  
 309 substrates of TCR activation (including CD3 $\zeta$ , ZAP-70, LAT, SLP-76 and PLC- $\gamma$ 1) were  
 310 markedly lower in the cells of the patient than in control cells (Fig 4, C). This cannot be  
 311 accounted by decreased expression of the tyrosine kinases FYN and ZAP-70 as their expression  
 312 levels were not modified and similar to those in control cells. Moreover, total protein amounts  
 313 were comparable as shown by the anti-ACTIN. Further examination of downstream events  
 314 showed no detectable  $\text{I}\kappa\text{B}$  phosphorylation (which when phosphorylated is a hallmark of NF-  
 315  $\kappa\text{B}$  activation), but residual phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinases 1/2  
 316 (ERK1/2) was observed (Fig 4, C, lower panels). Finally, we examined activation-induced cell  
 317 death which is one of the late T-cell responses requiring intact TCR signalling. In accordance  
 318 with a profound TCR signalling defect, LCK-deficient T-cell blasts displayed much lower levels  
 319 of activation-induced cell death than control T cell blasts (Fig 4, D). However, the functional  
 320 defects observed in the patient's T cells might be impacted by the abnormal expansion of CD8  
 321 TEMRA T cells.

322 Because no primary patient cells were available any longer at the time of this study,  
 323 indirect complementation experiments were next carried out to confirm that expression of  
 324 p.L341P mutant LCK resulted in a TCR signaling defect. The LCK-deficient JCaM 1.6 cell line,  
 325 a derivative of Jurkat cells that does not mobilize  $\text{Ca}^{2+}$  after TCR stimulation<sup>26</sup>, was transduced  
 326 with lentiviruses producing wt LCK or p.L341P LCK allele (Fig 5). Stable JCaM 1.6 cell lines

327 expressing wt LCK or p.L341P LCK were obtained (Fig 5, *A*) and, as previously shown in Fig 4,  
328 the expression of p.L341P LCK protein was diminished compared to that of wt LCK. Expression  
329 of wild-type LCK restored TCR-mediated  $\text{Ca}^{2+}$ -flux (Fig 5, *B*) and tyrosine phosphorylation  
330 signals (Fig 5, *C*) in JCaM 1.6 cells, whereas expression of p.L341P LCK protein had no effect  
331 ~~like-in~~ similar to cells transduced with an empty vector (LCK-deficient JCaM1.6 cells). We  
332 therefore conclude from these experiments that T cells expressing p.L341P LCK protein  
333 displayed a severe defect in early proximal TCR signaling.

334



## 334 Discussion

335 We report here the first case of human LCK deficiency caused by complete maternal UPD  
 336 of chromosome 1, which harbored the mutated *LCK* gene. UPD accounts for this recessive form  
 337 of pediatric primary immunodeficiency (PID) in this patient, with the *LCK* germinal mutation  
 338 being absent in the father and present in the patient's mother in the heterozygous state. UPD is  
 339 defined as the inheritance of a pair of duplicated chromosomes from a single parent, and it is  
 340 associated with two principal types of developmental risk: the occurrence of imprinting disorders  
 341 and the inheritance of a recessive trait.<sup>27</sup> In the patient, it can not be ruled out that other  
 342 homozygous mutations (or polymorphisms) in other genes in the chromosome 1 might be having  
 343 some clinical effects. Four autosomal recessive PIDs due to UPD have been reported to date,  
 344 including Chediak-Higashi syndrome (chromosome 1), cartilage hair hypoplasia (chromosome  
 345 9), perforin deficiency (chromosome 10) and IFN- $\gamma$  deficiency (chromosome 6).<sup>28-31</sup>

346 The immunological phenotype of the LCK-deficient patient reported here resembles that  
 347 of *lck*<sup>-/-</sup> mice, with T-cell lymphopenia, low levels of CD4 and CD8 expression at the cell surface,  
 348 and a lack of response to TCR activation.<sup>25, 32</sup> LCK has been shown to play a key role in the  
 349 initiation of TCR signaling following the recognition of MHC-peptide molecules. The expression  
 350 of p.L341P LCK protein led to a profound TCR signaling defect, with weak tyrosine  
 351 phosphorylation signals and an absence of Ca<sup>2+</sup> mobilization. However, some T cells developed  
 352 in the LCK-deficient patient with a large part corresponding to an oligoclonal expansion of the  
 353 CD8<sup>+</sup> T-cell compartment and the accumulation of  $\gamma\delta$ T cells. The expansion of T cells in this  
 354 context might have been driven by TCR dependent or independent stimuli.

355 In the absence of LCK, strong antigenic stimulations have been previously reported to  
 356 activate T cells bypassing LCK-dependent TCR signaling via a G $\alpha$ 11-dependent, PLC- $\beta$ -  
 357 mediated pathway.<sup>33</sup> FYN, which is involved in proximal TCR signaling, may also compensate

for the absence of LCK allowing partial development of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells in the patient. In mice, fyn contributes to T-cell development in the lck-deficient mice as double lck and fyn-deficient mice have a more severe phenotype with a complete block of  $\alpha\beta$  T-cell development.<sup>34</sup> However, the development of  $\gamma\delta$  T cells appears to be less dependent on lck than the  $\alpha\beta$  T-cell development.<sup>34, 35</sup> This is particularly true for  $\gamma\delta$  populations that have an extrathymic differentiation.<sup>36, 37</sup> Residual MAPK activation was observed in the patient's T cells while  $\text{Ca}^{2+}$ -flux was abolished. This could be explained by the fact that PLC- $\beta$ 1 activation is strictly dependent on LCK, whereas the MAPK pathway can be activated by both LCK and FYN.<sup>26, 38</sup> These mechanisms potentially account for the incomplete T-cell deficiency observed here in the LCK-deficient patient.

Three patients with CID characterized by T-cell  $\text{CD4}^+$  lymphopenia associated with low levels of LCK protein or LCK kinase activity have been reported before.<sup>10-12</sup> In these 3 patients LCK abnormalities were associated with the predominant expression of a naturally occurring alternative splice variant of *LCK* lacking exon 7 in their T cells. In one of these patients, with the most severe clinical and immunological phenotype, proximal TCR signals, including tyrosine phosphorylation signals,  $\text{Ca}^{2+}$ -flux and the activation of MAPKs, were assessed and found to be intact.<sup>12</sup> No causal genetic mutation of the *LCK* gene was identified in any of these three patients.<sup>10-12</sup> Thus, the CID phenotype in these patients could not be attributed to a primary genetic defect in the *LCK* gene.<sup>12</sup> However, decreased LCK expression and abnormal expression of the *LCK* splice variant (lacking exon 7) in these patients may have contributed to their clinical phenotype.

The consequences of the LCK deficiency in the patient reported here were severe: early-onset infections associated with protracted gut disease, failure to thrive, autoimmunity and

381 skin/mucosal inflammatory disorders. These clinical manifestations resemble those observed in  
 382 patients with early T-cell signaling defects (supplemental table 1), in particular patients with  
 383 ZAP-70 deficiency, given that ZAP-70 is the closest downstream effector of LCK in the TCR  
 384 signaling cascade.<sup>39-41</sup> However, an absence of ZAP-70 in humans is usually associated with  
 385 CD8<sup>+</sup> T-cell lymphopenia and normal CD4<sup>+</sup> T-cell counts. The autoimmunity and inflammatory  
 386 signs in the patient described here were associated with the expansion of an oligoclonal CD8<sup>+</sup> T-  
 387 cell population and putative skin-homing TCR $\alpha$  cells.<sup>24</sup> Defects in the control of self-reactive T  
 388 cells, due to abnormal TCR signaling strength in the absence of LCK, may have occurred in the  
 389 thymus during the negative and positive selection stages. Furthermore, T cells of the patient were  
 390 found to be resistant to activation-induced cell death and the Treg cell number of the patient was  
 391 low. Such alterations in factors involved in the peripheral tolerance may have also favoured the  
 392 escape of self-reactive T cells.<sup>42, 43</sup> The expansion of these CD8<sup>+</sup> T cells which have a TEMRA  
 393 phenotype might also result from lymphopenia-induced proliferation, driven by residual TCR  
 394 dependent or independent stimuli such as common  $\gamma$  chain cytokines<sup>44</sup>. Indeed, CD8<sup>+</sup> T cells are  
 395 more prone to lymphopenia-induced proliferation than CD4<sup>+</sup> T cells. Furthermore, TCR signalling  
 396 in naive CD8<sup>+</sup> T cells strongly depends on LCK while memory T cells are able to respond to  
 397 antigen independently of LCK<sup>45</sup>. In concert the above-mentioned mechanisms might have  
 398 contributed to the build-up of the severe immunodysregulation observed in the LCK-deficient  
 399 patient.

400         These observations highlight the frequent occurrence of autoimmunity and inflammation  
 401 in patients with CID and residual, or even normal peripheral T-lymphocyte counts due to  
 402 proximal TCR signaling defects (supplemental table 1).<sup>6-9, 39-41</sup> In summary, we report a new form  
 403 of profound T-cell immunodeficiency caused by LCK deficiency leading to susceptibility to  
 404 infections, inflammation and autoimmunity.



**405 Acknowledgments**

406 We thank the family for cooperation. S. L. is a senior scientist at the CNRS (France) and F.H. is a  
407 clinician at the University Children's Hospital of Dresden (Germany) and holds fellowships from  
408 the German Research Council/DFG (HA 5967/1-1) and the Fondation IMAGINE (France). S.G.  
409 holds a fellowship from the Ministère de la Recherche and l'Ecole Polytechnique (France) and  
410 the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer (ARC) (France). E. M. is supported by the  
411 ANR (France). We also thank Drs A. Durandy, A. Puel and M.-A. Alyanakian for their assistance  
412 with immunological and genetic investigations.

413

**414 Conflict of Interest Disclosures**

415 The authors have no competing financial interests to declare.

416

417

418

419

420

## 420 References

- 421 1. Salmond RJ, Filby A, Qureshi I, Caserta S, Zamoyska R. T-cell receptor proximal  
422 signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation,  
423 differentiation, and tolerance. *Immunol Rev* 2009; 228:9-22.
- 424 2. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 2009;  
425 27:591-619.
- 426 3. Fischer A. Human primary immunodeficiency diseases. *Immunity* 2007; 27:835-45.
- 427 4. Veillette A, Bookman MA, Horak EM, Bolen JB. The CD4 and CD8 T cell surface  
428 antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell*  
429 1988; 55:301-8.
- 430 5. Veillette A, Horak ID, Horak EM, Bookman MA, Bolen JB. Alterations of the  
431 lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (p56lck) during T-cell activation. *Mol Cell*  
432 1988; 8:4353-61.
- 433 6. Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel SH, Tanasa B, et al. A mutation in  
434 Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 2006;  
435 441:179-85.
- 436 7. Picard C, McCarl CA, Papolos A, Khalil S, Luthy K, Hivroz C, et al. STIM1 mutation  
437 associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. *N Engl J Med* 2009;  
438 360:1971-80.
- 439 8. Li FY, Chaigne-Delalande B, Kanellopoulou C, Davis JC, Matthews HF, Douek DC, et  
440 al. Second messenger role for Mg<sup>2+</sup> revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature*  
441 2011; 475:471-6.
- 442 9. Huck K, Feyen O, Niehues T, Ruschendorf F, Hubner N, Laws HJ, et al. Girls  
443 homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency  
444 develop fatal EBV-associated lymphoproliferation. *J Clin Invest* 2009; 119:1350-8.
- 445 10. Sawabe T, Horiuchi T, Nakamura M, Tsukamoto H, Nakahara K, Harashima SI, et al.  
446 Defect of lck in a patient with common variable immunodeficiency. *Int J Mol Med* 2001;  
447 7:609-14.
- 448 11. Hubert P, Bergeron F, Ferreira V, Seligmann M, Oksenhendler E, Debre P, et al.  
449 Defective p56Lck activity in T cells from an adult patient with idiopathic CD4+  
450 lymphocytopenia. *Int Immunol* 2000; 12:449-57.
- 451 12. Goldman FD, Ballas ZK, Schutte BC, Kemp J, Hollenback C, Noraz N, et al. Defective  
452 expression of p56lck in an infant with severe combined immunodeficiency. *J Clin Invest*  
453 1998; 102:421-9.
- 454 13. Ouederni M, Vincent QB, Frange P, Touzot F, Scerra S, Bejaoui M, et al. Major  
455 histocompatibility complex class II expression deficiency caused by a RFXANK founder  
456 mutation: a survey of 35 patients. *Blood* 2011; 118:5108-18.
- 457 14. Picard C, Dogniaux S, Chemin K, Maciorowski Z, Lim A, Mazerolles F, et al.  
458 Hypomorphic mutation of ZAP70 in human results in a late onset immunodeficiency and  
459 no autoimmunity. *Eur J Immunol* 2009; 39:1966-76.
- 460 15. Mateo V, Menager M, de Saint-Basile G, Stolzenberg MC, Roquelaure B, Andre N, et al.  
461 Perforin-dependent apoptosis functionally compensates Fas deficiency in activation-  
462 induced cell death of human T lymphocytes. *Blood* 2007; 110:4285-92.
- 463 16. Latour S, Gish G, Helgason CD, Humphries RK, Pawson T, Veillette A. Regulation of  
464 SLAM-mediated signal transduction by SAP, the X-linked lymphoproliferative gene  
465 product. *Nat Immunol* 2001; 2:681-90.
- 466 17. Rigaud S, Fondaneche MC, Lambert N, Pasquier B, Mateo V, Soulas P, et al. XIAP



- 467 deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* 2006;  
468 444:110-4.
- 469 18. Conche C, Boulla G, Trautmann A, Randriamampita C. T cell adhesion primes antigen  
470 receptor-induced calcium responses through a transient rise in adenosine 3',5'-cyclic  
471 monophosphate. *Immunity* 2009; 30:33-43.
- 472 19. Randriamampita C, Boulla G, Revy P, Lemaitre F, Trautmann A. T cell adhesion lowers  
473 the threshold for antigen detection. *Eur J Immunol* 2003; 33:1215-23.
- 474 20. Lim A, Baron V, Ferradini L, Bonneville M, Kourilsky P, Pannetier C. Combination of  
475 MHC-peptide multimer-based T cell sorting with the Immunoscope permits sensitive ex  
476 vivo quantitation and follow-up of human CD8+ T cell immune responses. *J Immunol*  
477 *Methods* 2002; 261:177-94.
- 478 21. Clappier E, Cuccuini W, Kalota A, Crinquette A, Cayuela JM, Dik WA, et al. The C-  
479 MYB locus is involved in chromosomal translocation and genomic duplications in human  
480 T-cell acute leukemia (T-ALL), the translocation defining a new T-ALL subtype in very  
481 young children. *Blood* 2007; 110:1251-61.
- 482 22. Willinger T, Freeman T, Hasegawa H, McMichael AJ, Callan MF. Molecular signatures  
483 distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. *J Immunol*  
484 2005; 175:5895-903.
- 485 23. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional delineation  
486 and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription  
487 factor. *Immunity* 2009; 30:899-911.
- 488 24. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of  
489 innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:467-78.
- 490 25. Molina TJ, Kishihara K, Siderovski DP, van Ewijk W, Narendran A, Timms E, et al.  
491 Profound block in thymocyte development in mice lacking p56lck. *Nature* 1992; 357:161-  
492 4.
- 493 26. Straus DB, Weiss A. Genetic evidence for the involvement of the lck tyrosine kinase in  
494 signal transduction through the T cell antigen receptor. *Cell* 1992; 70:585-93.
- 495 27. Kotzot D. Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from  
496 rare chromosomal complements. *J Med Genet* 2001; 38:497-507.
- 497 28. Prando C, Boisson-Dupuis S, Grant AV, Kong XF, Bustamante J, Feinberg J, et al.  
498 Paternal uniparental isodisomy of chromosome 6 causing a complex syndrome including  
499 complete IFN-gamma receptor 1 deficiency. *Am J Med Genet A* 2010; 152A:622-9.
- 500 29. Al-Jasmi F, Abdelhaleem M, Stockley T, Lee KS, Clarke JT. Novel mutation of the  
501 perforin gene and maternal uniparental disomy 10 in a patient with familial  
502 hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol* 2008; 30:621-4.
- 503 30. Dufourcq-Lagelouse R, Lambert N, Duval M, Viot G, Vilmer E, Fischer A, et al.  
504 Chediak-Higashi syndrome associated with maternal uniparental isodisomy of  
505 chromosome 1. *Eur J Hum Genet* 1999; 7:633-7.
- 506 31. Sulisalo T, Makitie O, Sistonen P, Ridanpaa M, el-Rifai W, Ruuskanen O, et al.  
507 Uniparental disomy in cartilage-hair hypoplasia. *Eur J Hum Genet* 1997; 5:35-42.
- 508 32. Molina TJ, Bachmann MF, Kundig TM, Zinkernagel RM, Mak TW. Peripheral T cells in  
509 mice lacking p56lck do not express significant antiviral effector functions. *J Immunol*  
510 1993; 151:699-706.
- 511 33. Bueno C, Lemke CD, Criado G, Baroja ML, Ferguson SS, Rahman AK, et al. Bacterial  
512 superantigens bypass Lck-dependent T cell receptor signaling by activating a Galpha11-  
513 dependent, PLC-beta-mediated pathway. *Immunity* 2006; 25:67-78.
- 514 34. van Oers NS, Lowin-Kropf B, Finlay D, Connolly K, Weiss A. alpha beta T cell

- 515 development is abolished in mice lacking both Lck and Fyn protein tyrosine kinases.
- 516 Immunity 1996; 5:429-36.
- 517 35. Fujise S, Matsuzaki G, Kishihara K, Kadena T, Molina T, Nomoto K. The role of p56lck
- 518 in the development of gamma delta T cells and their function during an infection by
- 519 *Listeria monocytogenes*. J Immunol 1996; 157:247-54.
- 520 36. Page ST, van Oers NS, Perlmutter RM, Weiss A, Pullen AM. Differential contribution of
- 521 Lck and Fyn protein tyrosine kinases to intraepithelial lymphocyte development. Eur J
- 522 Immunol 1997; 27:554-62.
- 523 37. Penninger J, Kishihara K, Molina T, Wallace VA, Timms E, Hedrick SM, et al.
- 524 Requirement for tyrosine kinase p56lck for thymic development of transgenic gamma
- 525 delta T cells. Science 1993; 260:358-61.
- 526 38. Lovatt M, Filby A, Parravicini V, Werlen G, Palmer E, Zamoyska R. Lck regulates the
- 527 threshold of activation in primary T cells, while both Lck and Fyn contribute to the
- 528 magnitude of the extracellular signal-related kinase response. Mol Cell Biol 2006;
- 529 26:8655-65.
- 530 39. Elder ME, Lin D, Clever J, Chan AC, Hope TJ, Weiss A, et al. Human severe combined
- 531 immunodeficiency due to a defect in ZAP-70, a T cell tyrosine kinase. Science 1994;
- 532 264:1596-9.
- 533 40. Chan AC, Kadlecsek TA, Elder ME, Filipovich AH, Kuo WL, Iwashima M, et al. ZAP-70
- 534 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency.
- 535 Science 1994; 264:1599-601.
- 536 41. Arpaia E, Shahar M, Dadi H, Cohen A, Roifman CM. Defective T cell receptor signaling
- 537 and CD8+ thymic selection in humans lacking zap-70 kinase. Cell 1994; 76:947-58.
- 538 42. Snow AL, Pandiyan P, Zheng L, Krummey SM, Lenardo MJ. The power and the promise
- 539 of restimulation-induced cell death in human immune diseases. Immunol Rev 2010;
- 540 236:68-82.
- 541 43. Wiegers GJ, Kaufmann M, Tischner D, Villunger A. Shaping the T-cell repertoire: a
- 542 matter of life and death. Immunol Cell Biol 2011; 89:33-9.
- 543 44. Sprent J, Surh CD. Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into
- 544 memory-phenotype cells. Nat Immunol 2011; 12:478-84.
- 545 45. Tewari K, Walent J, Svaren J, Zamoyska R, Suresh M. Differential requirement for Lck
- 546 during primary and memory CD8+ T cell responses. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;
- 547 103:16388-93.
- 548
- 549
- 550
- 551
- 552
- 553
- 554
- 555
- 556
- 557



Table 1. Immunological features of the patient

	23 months	29 months
<b>Lymphocytes (3600-8900/<math>\mu</math>l)<sup>1</sup></b>	2,200	1,300
<b>T cells (<math>\mu</math>l)</b>		
CD3 <sup>+</sup> (2,100-6,200)	1,254	520
CD4 <sup>+</sup> (1,300-3,400)	154	156
CD8 <sup>+</sup> (620-2,000)	1,012	338
<b>T cells (%)</b>		
TCR $\alpha$ $\beta$ cells (90-100)	ND	64.3
TCR $\gamma$ $\delta$ cells (0-10)	ND	33.5
CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD31 <sup>+</sup> (naive) (57-65)	7	ND
CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (memory) (7-20)	84	ND
CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> (71-94)	91	ND
CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup> (6-29)	6	ND
CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> (naive)	ND	8.4
CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> (effector memory)	ND	2.2
CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> (effector)	ND	87.1
CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> (<2) <sup>2</sup> (TEMRA)	ND	85
<b>T-cell proliferation (cpm <math>\times</math> 10<sup>3</sup>)</b>		
PHA (6.25 $\mu$ g/ml) (>50)	0.5	1
OKT3 (50 ng/ml) (>30)	4.0	0
PMA (10 <sup>-7</sup> M) + ionomycin (10 <sup>-5</sup> M) (>80)	40	36
PMA (10 <sup>-8</sup> M) + ionomycin (10 <sup>-6</sup> M) (>80)	66	31
Tetanus toxoid (>10)	2	ND
<b>NK cells (<math>\mu</math>l)</b>		
CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> (180-920)	440	ND
<b>B cells</b>		
CD19 <sup>+</sup> (720-2,600)	506	559
<b>Serum immunoglobulins</b>		
IgG (4.82-8.96 g/l)	8.7	ND
IgA (0.33-1.22 g/l)	1.21	ND
IgM (0.5-1.53 g/l)	3.06	ND
IgE (<2 KUI/l)	<2	ND
<b>Specific antibodies<sup>3</sup> (IU/ml)</b>		
Tetanus toxoid (>0.1)	0.05	ND
Diphtheria toxoid (>0.1)	<0.1	ND
Poliovirus type 1, 2, 3 (>40)	<10, <10, 20	ND
EBV	negative	
<b>Blood group allohemagglutinins</b>		
IgM-anti-A (>1:8)	1:128	ND
IgM-anti-B (>1:8)	1:8	ND
<b>Autoantibodies</b>		
ANA (<1:100)	1:1,600	ND
dsDNA (<4 IU/ml)	>50	ND
Rheumatoid factor (<20 IU/ml)	100	ND

<sup>1</sup>Age-matched normal values are indicated in brackets. <sup>2</sup>consistent with the phenotype of effector memory RA (TEMRA) T cells (see Supplemental Fig E2). <sup>3</sup>The patient had received 4 injections of a 7-valent conjugate vaccine against pneumococcus and 4 injections of a pentavalent vaccine against *H. influenzae* type b, *Diphtheria*, *B. pertussis*, tetanus and poliovirus at the ages of 2, 4, 6 and 14 months. She also received 2 injections of a vaccine against measles, rubella and mumps at the ages of 12 and 16 months.

564  
565 **Legends Figures**

566 **Fig 1. Decreased expression of CD4 and CD8 molecules on T cells of the patient.** Flow  
567 cytometry analyses of the expression of CD3, CD4 and CD8 on whole blood cells (histograms)  
568 and expanded in vitro T-cell blasts (dot-plots) from a healthy control donor (Ctr. in blue) and the  
569 patient (Pat. in red), after gating on TCR<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> cells. Histograms and dot plots for the control and  
570 the patient have been superimposed.

571

572 **Fig 2. The patient is a carrier of a homozygous missense mutation in *LCK*.** (A) Pedigree of  
573 the family of the patient (circle = mother, square = father, slashed solid circle = deceased patient,  
574 diamond = unborn sibling) and the associated electropherograms depicting the region of coding  
575 exon 9 of *LCK* containing the homozygous T1022C mutation (indicated by an arrowhead). (B)  
576 Structure of the LCK protein and organization of its genomic locus. Dashed boxes correspond to  
577 non protein-coding exons and numbered solid boxes to protein-coding exons. The spotted box  
578 corresponds to the unique domain involved in binding to CD4 and CD8, the blue box to the Src-  
579 homology 2 (SH3) domain, the red box to the SH2-domain and the gray box to the kinase domain  
580 with the ATP-binding site lysine 273 (K273) and the proton acceptor site aspartic acid 364  
581 (D364). The localization of the T1022C mutation in *LCK*, resulting in the replacement of the  
582 leucine residue in position 341 with a proline residue (L341P) in LCK is indicated by  
583 arrowheads. (C) Chip-based single nucleotide polymorphism (SNP) analysis of chromosome 1 of  
584 the patient, revealing a homozygous SNPs profile, with two copies of the entire chromosome 1.  
585 The chromosome 1 is depicted below with *LCK* indicated by an arrow. Each red dots are  
586 corresponding to each SNP analyzed and to its position on the chromosome 1. The upper graph  
587 corresponds to the copy number of the SNPs and the lower graph shows the level of homozygosity



588 of the SNPs.

589

590 **Fig 3. Structure, expression and kinase activity of the mutant p.L341P LCK protein.**

591 (A) Ribbon representation of the 3D structure of human LCK (pdb identifier 3bym), highlighting  
 592 the position of L341, as well as the position of the active site. Ribbons are rainbow colored, from  
 593 blue to red. At right, focus on the region in which L341 is situated, highlighting its hydrophobic  
 594 neighbours (L328, L336 and I433). (B) Immunoblots showing the expression of wt LCK and  
 595 p.L341P LCK in cell lysates prepared from PBMCs of a healthy control individual (Ctr.) and the  
 596 patient (Pat.), respectively and from non transfected 293-T cells or transfected 293-T cells  
 597 expressing wt LCK or p.L341P LCK. The upper arrowheads correspond to post-translationally  
 598 modified forms of LCK, whereas the lower arrowheads indicate unmodified LCK. (C)  
 599 Immunoblots showing the kinase autophosphorylation of wt LCK and p.L341P LCK. The wt  
 600 LCK or p.L341P LCK protein was recovered from cell lysates of transfected 293-T cells or non-  
 601 transfected cells (lane 1), by immunoprecipitation (IP), and tested for kinase activity in the  
 602 presence of ATP. Different amounts of proteins were immunoprecipitated. All  
 603 immunoprecipitations were adjusted with lysates from non-transfected 293-T cells, to ensure the  
 604 precipitation of 1 mg of total protein. Immunoprecipitation was carried out in duplicate and the  
 605 products were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against  
 606 phosphorylated tyrosine residues (anti-PY) or LCK, to control the levels of immunoprecipitated  
 607 LCK.

608

609 **Fig 4. The T-cell receptor signaling cascade is defective in T cells of the patient. (A, B)**

610 Analyses of  $\text{Ca}^{2+}$ -flux in  $\text{CD3}^+$ ,  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$  T cells of a control (in blue) and the patient (in  
 611 red). Cells were stimulated with anti-CD3 antibodies and then incubated with ionomycin or

thapsigargin to induce a receptor-independent  $\text{Ca}^{2+}$  response. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels are expressed in arbitrary units (A.U.). (A) Flow cytometry analyses of  $\text{Ca}^{2+}$ -flux in  $\text{CD3}^+$ ,  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$  T cells from the PBMCs loaded with the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive fluorescent dye Indo-1. (B) Fluorescence imaging analyses of the  $\text{Ca}^{2+}$ -response in T-cell blasts loaded with the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive fluorescent dye Fura-2. Curves show the mean of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels of 23 (control) and 43 (patient) individual cells analyzed. (C) Immunoblots showing the phosphorylation signals in T-cell blasts from a control donor (Ctr.) and the patient (Pat.) stimulated with anti-CD3 antibodies for 0, 5 and 10 minutes. Cell lysates were prepared, resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against tyrosine-phosphorylated residues (anti-PY), ZAP-70, LCK, phosphorylated ERK1/2 (anti-P-ERK1/2), phosphorylated  $\text{I}\kappa\text{B}$  (anti-P- $\text{I}\kappa\text{B}$ ), FYN and ACTIN as a loading control. Arrows on the left indicate known tyrosine-phosphorylated substrates of TCR activation, including, from top to bottom: PLC- $\zeta$ , SLP-76, ZAP-70, LAT and the zeta-chain. Molecular weights are on the right. (D) Apoptosis of  $\text{CD3}^+\text{TCR}^{\text{hi}}$  or  $\text{CD3}^+\text{TCR}^{\text{lo}}$  cells from T-cell blast cultures for two control individuals (Ctr.1 and Ctr.2) and the patient (Pat.). Cells were stimulated with coated anti-CD3 antibody for 24 h.

**Fig 5. The mutant p.L341P LCK is not able to restore TCR-mediated  $\text{Ca}^{2+}$ -flux and tyrosine phosphorylation signals in the LCK-deficient Jurkat cell line JCaM 1.6.** (A) Analysis of LCK expression in cell lysates prepared from JCaM 1.6 cells transduced with wt LCK, p.L341P LCK or the empty vector by immunoblotting with anti-LCK Ab. Non-transduced JCaM 1.6 cells and LCK-expressing Jurkat E6 cells have been also analyzed. (B) Analyses of  $\text{Ca}^{2+}$ -flux in JCaM 1.6 cells transduced with the empty vector (black), wt LCK (green) or p.L341P LCK (red) stimulated with anti-CD3 antibody and then with ionomycin. Cells were loaded with the  $\text{Ca}^{2+}$ -

635 sensitive fluorescent dye Fura-2 and analyzed by spectrofluorimetry. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels are  
636 in arbitrary units (A.U.). (C) Immunoblots showing tyrosine phosphorylation signals in JCaM 1.6  
637 cells transduced with the empty vector, wt LCK or p.L341P LCK. Cells were stimulated by  
638 incubation with soluble UCHT-1 (anti-CD3) (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 0, 2, 5, 15 and 30 minutes. Cell lysates  
639 were prepared, resolved by SDS-PAGE and immunoblotted to tyrosine-phosphorylated residues  
640 (anti-PY), LCK and ACTIN as a loading control.

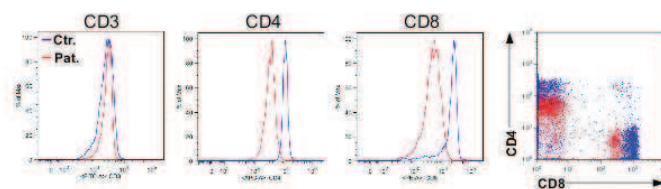


Figure 1

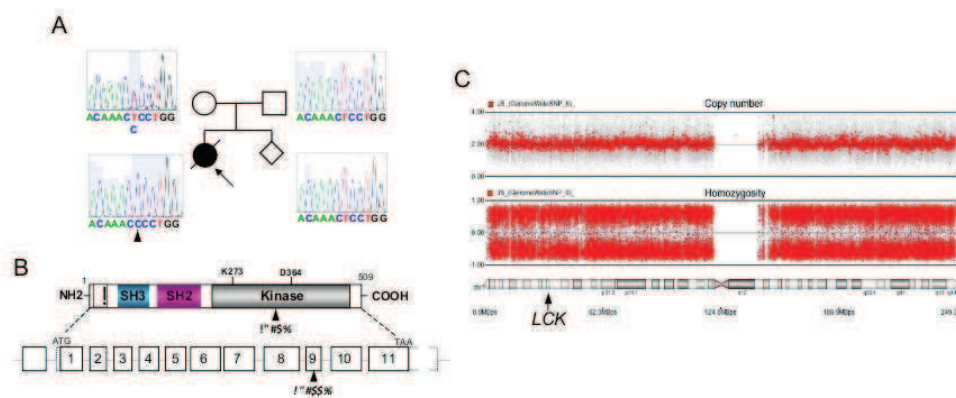


Figure 2



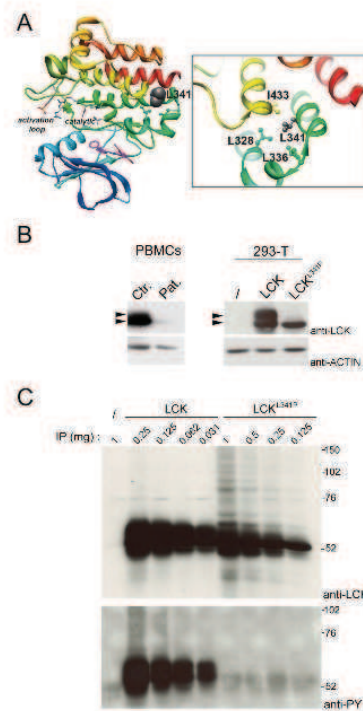


Figure 3

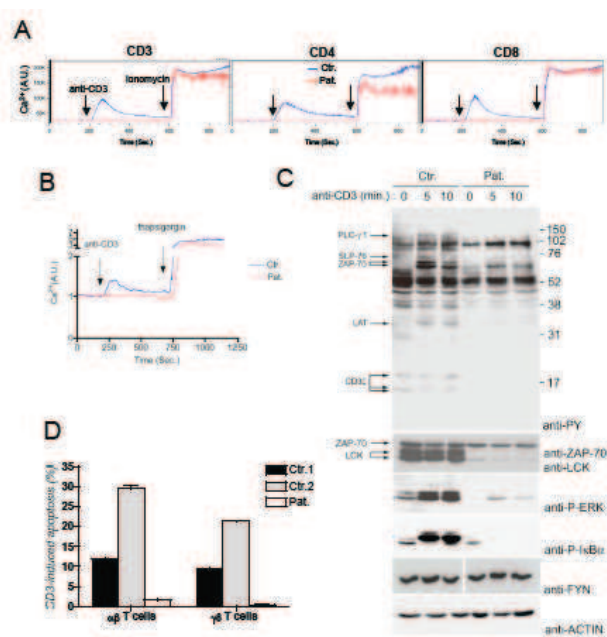


Figure 4

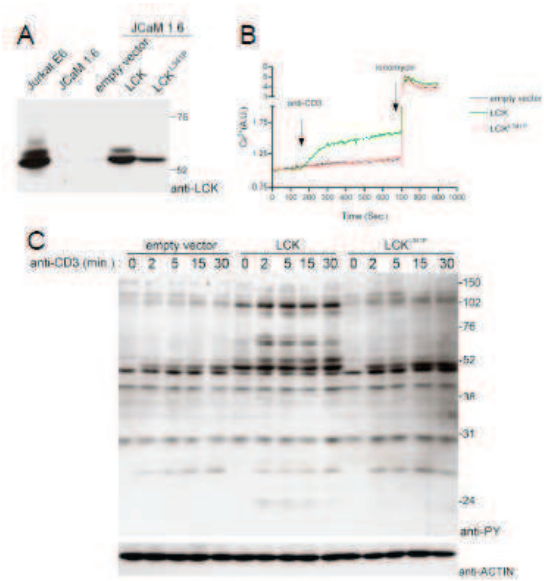


Figure 5